

**Synthese en karakterisatie van
polymeriseerbare Pluronic® derivaten
als kandidaat hydrogelen voor zachte
weefselregeneratie.**

Leden van de examencommissie

Promotoren

Prof. Dr. Peter Dubruel (Ghent University)

Prof. Dr. Sandra Van Vlierberghe (Ghent University)

Interne leden

Prof. Dr. Richard Hoogenboom (Voorzitter, Ghent University)

Dr. Ir. Arn Mignon (Secretaris, Ghent University)

Prof. Dr. Frederic Lynen (Ghent University)

Externe experts

Prof. Dr. Timoty Noël (University of Eindhoven)

Prof. Dr. Heidi Declercq (KU Leuven)

Dankwoord

Het vervolledigen van deze doctoraatsthesis zou niet mogelijk geweest zijn zonder de professionele en vriendschappelijke steun van vele personen. Daarom wil ik mij in deze paragraaf richten tot hen en mijn oprechte dank betuigen.

In de eerste plaats wens ik mijn promotor Prof. Dr. Peter Dubruel te bedanken voor de kansen die hij me geboden heeft om een doctoraatsthesis uit te voeren en co-promotor Prof. Dr. Sandra Van Vlierberghe voor de wetenschappelijke input, hulp en de uren in het labo. Voor de financiële steun kon ik naast mijn promotor en de Vakgroep Organische en Macromoleculaire Chemie rekenen op de Universiteit van Gent voor het ter beschikking stellen van een BOF beurs. Bij het uitwerken van dit werk kon ik rekenen op de steun van verschillende onderzoeksgroepen binnen en buiten de Universiteit Gent. Hiervoor had ik graag volgende personen mijn blijken van dank gegeven: Prof. R. Cornelissen en Elke Berneel (Vakgroep Medische Basiswetenschappen, Faculteit Geneeskunde en gezondheidswetenschappen, UGent) alsook Prof. Lorenzo Fassina (Università di Pavia, Italië).

Verder wens ik mijn collega's binnen de PBM groep te bedanken voor de zeer aangename jaren. Vooreerst mijn labocollega's Els, Diana en Birgit en verder in willekeurige volgorde: Tim VG, Tim DS, Stijn, Arne, Thomas, Mieke, Valérie, Geert-Jan, Diana, Elke. Ook de post-docs Kenny, Ana, Timothy, Diana en Sangram. Alsook de vele thesisstudenten die de voorbije jaren de revue zijn gepasseerd verdienen een woord van dank. Een bijzonder woord gaat uit naar

labomanager Veerle Boterberg, voor haar bijdrage aan de analyses. Binnen de vakgroep wens ik nog een aantal collega's te bedanken die het werken aangenaam maakten: Tim Courtin, Veerlde Van de Velde, Ingrid Denaene en de mensen van de centrale werkplaats: Joris, Mario, Frank, Tim en Theo. Ook wil ik een aantal mensen buiten de universiteit bedanken. Mijn petekindje Matteo en de ouders Jan en Annelies voor de morele steun. Christian voor de bemoedigende gesprekken. Last but not least, zijn er de mensen die rondom mij geweest zijn van kindsbeen af, familie en vrienden. Vooral mijn broer Koen en mijn ouders. Uiteraard was dit niet mogelijk geweest zonder hun steun. Aan allen: hartelijk bedankt!

Jorg Schelfhout

Inhoud

I Inleiding.	15
I.1. Probleemstelling.	15
I.2. Doelstelling.	16
I.3. Hydrogelen als een kandidaat biomateriaal voor weefselregeneratie.	17
I.3.1. Overzicht van natuurlijke hydrogelen en hun toepassing als biomateriaal.	19
I.3.2. Overzicht van synthetische hydrogelen en hun toepassing als biomateriaal.	23
I.3.3. Criteria voor hydrogeleigenschappen als draagstructuur voor weefselregeneratie.	27
I.4. Intergeconnecteerde 3D hydrogel draagstructuren via 'rapid prototyping'.	31
I.4.1. De multidisciplinaire noden van een biomimetische draagstructuur.	31
I.4.2. Controle van de interne en de externe geometrie van een draagstructuur.	34
I.4.3. Klassificatie van 'rapid prototyping' technieken voor de verwerking van hydrogelen.	35
I.5. PEO-PPO-PEO blokcopolymeren: Pluronic[®].	38
I.5.1. Synthese, nomenclatuur en fysische eigenschappen van Pluronic [®] .	40
I.5.2. De thermoreversibele gelering van Pluronic [®] in water.	43
I.5.3. De toxicologische eigenschappen van Pluronic [®] .	44
I.5.4. Het gebruik van Pluronic [®] F127 in medische en farmaceutische toepassingen.	45
I.6. Concept	48
II Synthese en karakterisatie van Pluronic[®] macromonomeren.	50
II.1. Inleiding.	50
II.2. Synthese en karakterisatie van Pluronic[®] F127 bismethacrylaat.	52
II.3. Synthese en karakterisatie van Pluronic[®] F127 bisamine.	56
II.4. Synthese en karakterisatie van Pluronic[®] F127 bisacrylamide.	61
II.5. Synthese en karakterisatie van Pluronic[®] F127 bisthiol.	64
II.6. Synthese en karakterisatie van Pluronic[®] F127 bisthioacetaat.	66
II.7. Synthese en karakterisatie van Pluronic[®] F127 di-IPTS.	68
II.8. Conclusies.	71
III Fysico-chemische evaluatie van Pluronic[®] macromonomeren.	72
III.1. Inleiding.	72
III.2. Miceleringseigenschappen van PEO-PPO-PEO blokcopolymeren.	72
III.2.1. De thermodynamica van het miceleringsproces van PEO-PPO-PEO blokcopolymeren.	74
III.2.2. Vertroebelingsfenomenen van Pluronic [®] F127 oplossingen in water.	78
III.2.3. Bepaling van de kritische miceliseigenschappen van Pluronic [®] F127 oplossingen.	80
III.2.4. Invloed van de chemische eindgroepmodificatie van Pluronic [®] F127 op de micelgrootte.	86
III.3. Geleringseigenschappen van PEO-PPO-PEO blokcopolymeren.	91
III.3.1. Inleiding.	91
III.3.2. Bepaling van het visco-elastisch gedrag van hydrogelen met oscillatiereologie.	92
III.3.3. Calorimetrische studie van de sol-gel transitie van Pluronic [®] .	100
III.3.4. Studie van de sol-gel transitie van Pluronic [®] met behulp van de 'tube inversion method'.	103
III.4. Conclusies.	108

IV Ontwikkeling en karakterisatie van covalent vernette Pluronic® F127 hydrogelen.	109
IV.1. Inleiding.	109
IV.2. Vernetting van vinyl gebaseerde Pluronic® F127 macromonomeren.	110
IV.2.1. Irgacure 2959 als foto-initiator voor biomedische toepassingen.	110
IV.2.2. Inloed van de polymeerconcentratie op de gelfractie voor een Pluronic® F127 BMA hydrogel.	112
IV.2.3. Bepaling van de zwellingsisothermen voor een Pluronic® F127 BMA hydrogel.	113
IV.2.4. 'Real-time' evaluatie van de visco-elastische eigenschappen van een Pluronic® F127 BMA hydrogel.	115
IV.2.5. Karakterisatie van de thermoresponsieve eigenschappen van een covalent vernette Pluronic® F127 BMA hydrogel.	117
IV.2.6. Toepassing van Pluronic® F127 BMA gebaseerde hydrogelen als reservoir voor de vrijstelling van macromoleculen.	119
IV.3. Vernetting van thiol-acrylaat gebaseerde Pluronic® F127 macromonomeren.	122
IV.3.1. Mechanisme van de thiol-een polymerisatiereactie.	124
IV.3.2. Hydrogelen bekomen uit een Pluronic® F127 bithiol met een acrylaat vernetter.	126
IV.3.3. Hydrogelen bekomen uit een Pluronic® F127 bisacrylaat met commerciële thiol vernetter.	131
IV.3.4. Zwelling en degradatie van Michaël-type vernette Pluronic® F127 hydrogelen.	133
IV.4. Vernetting van ethoxysilaan gebaseerde Pluronic® F127 macromonomeren.	136
IV.5. Karakterisatie van de mechanische eigenschappen van Pluronic® F127 hydrogelen via texturometrie.	140
IV.6. Conclusies.	144
V Ontwikkeling van extracellulaire matrix mimetische structuren.	146
V.1. Inleiding.	146
V.1.1. Oppervlaktemodificaties voor de ontwikkeling van ECM mimetische structuren en het bioherkenningsproces.	146
V.1.2. Atmosferische druk plasmabehandeling voor het modifieren van een biomateriaaloppervlak.	148
V.1.3. Analysetechnieken voor de karakterisatie van een biomateriaaloppervlak.	149
V.2. Het toepassen van poly(dopamine) coatings voor het functionaliseren van een biomateriaaloppervlak.	152
V.2.1. De autopolymerisatiemechanismen van dopamine.	155
V.2.2. Bepaling van de oppervlaktesamenstelling van een dopamine/poly(dopamine) coating op goud door XPS.	160
V.2.3. Synthese en karakterisatie van dopamine methacrylamide.	163
V.2.4. Introductie van koolstof-koolstof dubbele bindingen op een goudoppervlak door dipcoating met dopamine methacrylamide.	167
V.3. Fosforylcholine als een biomimetisch celmembraan.	170
V.3.1. Synthese en karakterisatie van het 2-methacryloyloxyethyl fosforylcholine.	171
V.3.2. Immobilisatie van MPC via copolymerisatie met een monolaag van DAMA.	173
V.3.3. Immobilisatie van MPC via een entpolymerisatie met benzofenon.	175
V.3.4. Copolymerisatie van MPC met Pluronic® F127 BMA.	180
V.4. Preliminare <i>in vitro</i> biologische evaluatie.	182
V.4.1. Inleiding.	182
V.4.2. Bepalen van de celviabiliteit via calcein AM/PI en MTT.	183
V.4.3. Impact van de opgeloste Pluronic® derivaten op de cytotoxiciteit.	184
V.4.4. Celviabiliteit in contact met Pluronic® hydrogelen.	186
V.4.5. Celviabiliteit van ingekapselde cellen in Pluronic® hydrogelen.	188
V.4.6. Effect van de bisacrylaat-thiol vernetting op de celrespons.	190
V.5. Conclusies.	192
VI Productie van 3D draagstructuren via de bioplotter technologie.	193
VI.1. Inleiding.	193
VI.2. De bioplotter voor de verwerking van thermoresponsieve hydrogelen.	193
VI.2.1. Pluronic® F127 en derivaten als sacrificiële bioinkt.	195

VI.3. Procesmodellen voor de 3D productie van Pluronic® F127 BMA draagstructuren.	196
VI.3.1. Pluronics® als niet-Newtoniaanse vloeistof.	196
VI.3.2. Procesmodel voor de strutdiameter.	197
VI.3.3. Procesmodel voor het debiet.	200
VI.3.4. Procesmodel voor porositeit.	205
VI.4. Ontwerp en architectuur voor de 3D productie van Pluronic® F127 BMA draagstructuren.	207
VI.4.1. Controle van de strutdiameter.	207
VI.4.2. Controle van het debiet.	209
VI.4.3. Controle van de poriëngrootte en porositeit.	211
VI.4.4. De sleutelparameters voor het plotten van een Pluronic® F127 BMA oplossing.	217
VI.5. Polymeerverwerking via elektrospinnen van Pluronic® F127 derivaten.	219
VI.5.1. Variabelen van het elektrospinningsproces.	221
VI.5.2. Elektrospinnen van Pluronic® F127 di-IPTS.	221
VI.6. Conclusies.	224
VII Conclusies.	226
VII.1. Algemeen besluit.	226
VII.2. Toekomstperspectieven.	231
VIII English summary.	234
VIII.1. Introduction.	234
VIII.2. Synthesis and characterization of Pluronic® F127 macromonomers.	234
VIII.3. Physico-chemical evaluation of Pluronic® F127 macromonomers.	235
VIII.4. Development and characterization of covalently cross-linked Pluronic® F127 hydrogels.	236
VIII.5. Development of extracellular matrix mimetic (ECM) structures.	238
VIII.6. Production of 3D scaffolds by using the bioplotter technology.	239
VIII.7. Conclusions & future perspectives.	239
IX Experimenteel deel.	242
IX.1. Materialen.	242
IX.2. Overzicht van methoden.	243
IX.3. Synthese en karakterisatie van de Pluronic® macromonomeren.	244
IX.3.1. Synthese van Pluronic® F127 bismethacrylaat.	244
IX.3.2. Synthese van Pluronic® F127 bistosylaat.	245
IX.3.3. Synthese van Pluronic® F127 bisamine.	245
IX.3.4. Synthese van Pluronic® F127 bisacrylamide.	246
IX.3.5. Synthese van Pluronic® F127 bisthiol.	246
IX.3.6. Synthese van Pluronic® F127 bisthioacetaat.	247
IX.3.7. Synthese van Pluronic® F127 di-IPTS	247
IX.4. Fysico-chemische evaluatie van Pluronic® macromonomeren.	247
IX.4.1. Studie van de miceleringseigenschappen van Pluronic® F127.	248
IX.4.2. Bepaling van de miceldiameter door DLS.	248
IX.4.3. Bepaling van de geleringseigenschappen.	249

IX.5. Ontwikkeling en karakterisatie van covalent vernette Pluronic® F127 hydrogelen.	250
IX.5.1. Productie van vernette hydrogelen.	250
IX.5.2. Bepaling van de gelfractie en de zwellingsgraad van de vernette hydrogelen.	251
IX.5.3. 'Texture Profile Analysis' (TPA) en de bepaling van de compressiemodulus via texturometrie.	252
IX.5.4. Reologische analyse van de vernette hydrogelen.	253
IX.5.5. In situ evaluatie van de vernettingsreactie met behulp van foto-reologie.	253
IX.5.6. Opstellen van het temperatuursafhankelijk zwellingsdiagramma van Pluronic® F127 BMA.	254
IX.5.7. Ellman's methode voor de kwantitatieve bepaling van vrije thiolen.	254
IX.5.8. Bepalen van de statische contacthoeken op de hydrogelen.	255
IX.5.9. FITC dextraan vrijstelling.	255
IX.5.10. Vrijstelling van BSA.	256
IX.6. Ontwikkeling van extracellulaire matrix mimetische structuren.	257
IX.6.1. Beschrijving van de atmosferische druk plasma opstelling.	257
IX.6.2. Synthese van dopamine methacrylamide.	258
IX.6.3. Depositie van dopamine methacrylamide op goud door dipcoating.	259
IX.6.4. Synthese en karakterisatie van 2-(methacryloyloxy)ethyl fosforylcholine (PCM).	259
IX.6.5. Immobilisatie van MPC op een oppervlak.	261
IX.6.6. Bepalen van de hoeveelheid geabsorbeerde benzofenon.	262
IX.7. <i>In vitro</i> biologische evaluatie.	262
IX.8. Productie van draagstructuren van Pluronic®	263
IX.8.1. Productie van 3D draagstructuren van Pluronic® F127 BMA met de bioplotter.	263
IX.8.2. Elektrospinnen van Pluronic® triethoxysiloxaan.	264
X Bibliografie.	265
XI Lijst van publicaties.	298

Lijst met gebruikte afkortingen en symbolen

3DP	'three-dimensional printing'
AEMA:	2-aminoethyl methacrylaat
AFM:	'atomic force microscopy', atomaire krachtmicroscopie
CAD:	'computer aided design'
CAM:	'computer aided manufacturing'
CFM:	confocale fluorescentie microscopie
CNC:	'computer numerical control'
CT:	'computed tomography'
DBD:	'dielectric barrier discharge'
DP:	'degree of polymerization', polymerisatiegraad
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMEM:	'Dulbecco's modified eagle medium'
DMF:	N,N-dimethylformamide
DNA:	deoxy ribonucleïnezuur
DSC:	differentiële scanning calorimetrie
ECM:	extracellulaire matrix
EDC:	1-ethyl-3(-3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA:	ethyleendiamine-tetra-azijnzuur
ESP:	elektrospinning
EtOH:	ethanol
Et ₃ N:	triethylamine
FDA:	'Food and Drug Administration'
FDM:	'fused deposition modelling'
FGF:	fibroblast groeifactor
FTIR:	fourier transform infrarood
GPC:	gelpermeatiechromatografie

HA:	hydroxyapatiet
HOAc:	azijnzuur
HCA:	hydroxyl koolstof apatiet
hESC:	humane embryonale stamcellen
hMSC:	humane mesenchymale stamcellen
^1H – NMR:	proton nucleaire magnetische resonantie
HXD:	1,6-hexaandiol
IR:	infrarood
KT:	kamertemperatuur
LA:	lactide
MeOH:	methanol
MRI:	'magnetic resonance imaging', kernspintomografie
MDM:	'multinozzle deposition <i>manufacturing</i> '
MW:	gemiddeld moleculair gewicht
MWCO:	moleculair gewicht 'cut off'
pAEMA:	poly(2-aminoethyl methacrylaat)
PCL:	poly(ϵ -caprolacton)
PEG:	poly(ethyleen glycol)
PEO:	poly(ethyleen oxide)
PDI:	polydispersiteitsindex
PGA:	poly(glycolide)
PLA:	poly(lactide)
PLGA:	poly(lactide-co-glycolide)
PMMA:	poly(methyl methacrylaat)
ppm:	'parts per million'
PPO:	poly(propyleen)
PS:	poly(styreen)
PZT:	piëzo-elektrische 'transducer'

RGD:	arginine-glycine-asparaginezuur tripeptide
ROP:	ringopeningpolymerisatie
RP:	'rapid prototyping'
RM:	'rapid manufacturing'
RT:	'rapid tooling'
SCA:	'static contact angle', statische contacthoek
SEI:	'secondary elektron mode'
SEM:	'scanning elektron microscopy', rasterelektronenmicroscop
SLA:	'stereolithography apparatus'
SFF:	'solid freeform fabrication'
SLS:	'selective laser sintering'
SMC:	'smooth muscle cell'
SME:	vormgevingsgeheugen
SPR:	'surface plasmon resonance'
STL:	stereolithografie
Sulfo-NHS:	sulfo-N-hydroxysuccinimide
TCPS:	'tissue culture plates', weefselcultuurplaten
TGA:	thermogravimetrische analyse
THF:	tetrahydrofuraan
TMS:	tetramethylsilaan
rpm:	toeren per minuut
UV:	ultraviolet
VEGF:	'vascular endothelial growth factor', vasculaire endotheliale groeifactor
XPS:	'X-ray photoelektron spectroscopy', X-straal foto-elektronenspectroscopie
Zn(OAc) ₂ :	zinkacetaat
d1:	'strut' diameter
d2:	'interstrut' afstand
d3:	hoogte van strut in Z-richting

ϵ_{kl} :	'strain'
C_{ijkl} :	elasticiteitsmodulus tensor
F:	constante van Faraday ($F=96485,3399 \pm 0,0024 \text{ C.mol}^{-1}$)
l:	zijde van een kubus
LC50/EC50	letale-concentratiediaan/effectieve-concentratiediaan
LDM:	'low temperature deposition manufacturing'
M_i :	moleculair gewicht van molecule i
M_n :	'number average molecular weight', getalgemiddeld moleculair gewicht
M_w :	'weight average molecular weight', gewichtsgemiddeld moleculair gewicht
N_i :	aantal moleculen i
PAM:	'pressure-assisted microsyringe'
PED:	'precision extrusion deposition'
PEM:	'precision extrusion manufacturing'
R:	de gasconstante (algemene gasconstante of molaire gasconstante)
T:	temperatuur
T_g :	glastransitietemperatuur
$T_{g, \text{DSC}}$:	glastransitietemperatuur bepaald via DSC
T_m :	smelttemperatuur
T_vl :	vloeitemperatuur
σ_{ij} :	'stress', spanning
ΔE^0 :	standaard elektrochemische potentiaal
θ_b :	brekingshoek
θ_i :	invalshoek
θ_k :	kritische hoek
θ_r :	reflectiehoek
.stl:	(STT) formaat van dataopslag

I Inleiding.

I.1. Probleemstelling.

Cellen die zich bevinden in een fysiologische 3D omgeving verschillen van deze in een 2D weefselcultuur aanzienlijk wat betreft hun morfologie en hun differentiatiepotentieel (1). Deze 3D matrices zijn complex wat betreft hun chemische compositie, mechanische eigenschappen en hun geometrie (1). Ondanks het zeer intensieve onderzoek naar nieuwe materialen, blijft de nood aan innovatie en bijkomend onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden groot. De biocompatibiliteit, in combinatie met de fysische eigenschappen en grote watergehaltes zorgt ervoor dat hydrogelen interessante materialen zijn voor weefselregeneratie (2-3). Hierbij spelen de fabricatietechnieken, de geselecteerde materialen, hun architectuur, hun biochemische functionalisatie en hun mechanische eigenschappen een belangrijke rol. De recente vooruitgang in de micro- en nanofabricatietechnieken heeft het mogelijk gemaakt om substraten te produceren met nauwkeurig gedefinieerde geometrie en structuur. Desondanks recente vooruitgang zijn er multidisciplinaire inspanningen nodig voor de productie van een geschikte 3D draagstructuur (4). Voor de productie van 3D draagstructuren voor celculturen, dient de 3D architectuur gecontroleerd te worden op topologisch vlak, zowel op macro-, micro- als nanoschaal. Bovendien is kennis van en controle over de chemische eigenschappen van een individuele 3D draagstructuur cruciaal.

I.2. Doelstelling.

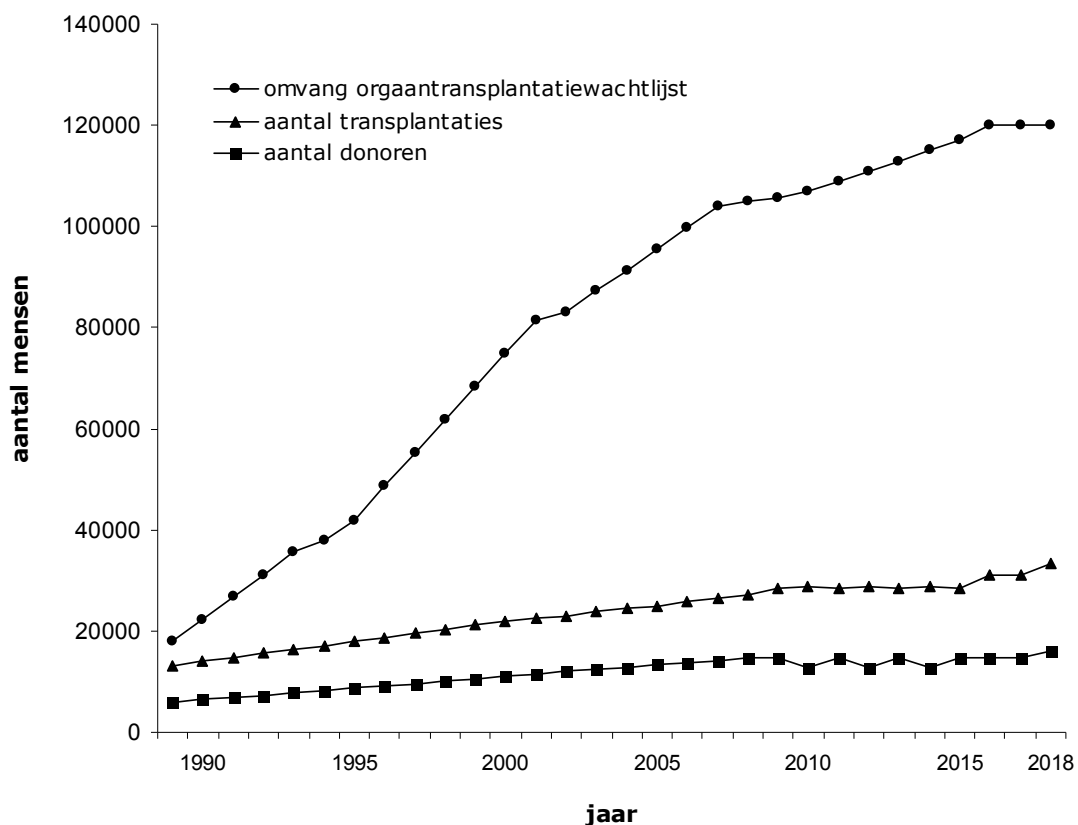
Het huidige werk heeft als belangrijkste doelstelling een bijdrage te leveren tot het ontwikkelen van een succesvolle methodiek voor zachte weefselregeneratie door gebruik te maken van een nieuwe generatie poreuze hydrogelen. Aangezien de verdeling van cellen doorheen een draagstructuur van cruciaal belang is, worden er biomaterialen ontwikkeld door gebruik te maken van de bioplotter technologie. Met behulp van deze innovatieve 'rapid prototyping' techniek kan men laagsgewijs een perfecte interconnectieve draagstructuur bouwen van Pluronic® gebaseerde hydrogelen. Het interconnectief karakter van de geproduceerde materialen dient celmigratie doorheen de volledige structuur toe te laten.

Een innovatief aspect van het huidige onderzoek omvat de synthese van een reeks vernetbare Pluronic® derivaten die gekarakteriseerd worden op hun celbiologische eigenschappen. Het vooropgestelde onderzoek kan worden onderverdeeld in onderstaande deelaspecten:

- (1) Synthese en karakterisatie van Pluronic® macromonomeren.
- (2) Fysico-chemische evaluatie van Pluronic® macromonomeren.
- (3) Ontwikkeling en karakterisatie van covalent vernette Pluronic® hydrogelen.
- (4) Ontwikkeling van extracellulaire matrix mimetische structuren en preliminaire biologische evaluatie.
- (5) Productie van 3D draagstructuren via de bioplotter technologie.

I.3. Hydrogelen als een kandidaat biomateriaal voor weefselregeneratie.

Het intensieve onderzoekswerk dat in de afgelopen decennia werd uitgevoerd rond weefselregeneratie kan het best begrepen worden uit een steeds toenemende nood aan organen en weefsels (1, 5-7). Men kan deze wetenschap beschouwen als het produceren en vervangen van levend lichaamsweefsel (8). Het belang van dit onderzoeksdomein wordt geïllustreerd door de steeds groter wordende kloof tussen vraag en aanbod van organen en weefsels voor transplantatie. Zoals weergegeven in Figuur I.3.1 persisteert zich deze trend in functie van de tijd (9). In 2018 vonden er 33.430 transplantaties plaats en was er een wachtlijst van 114.225 patiënten (10).



Figuur I.3.1 - Overzicht van orgaantransplantatiewachtlijst, aantal transplantaties en aantal donoren in functie van de tijd (USA) (10).

Om weefselregeneratie mogelijk te maken, worden er reeds verschillende strategieën aangewend waaronder het gebruik van draagstructuren welke de rol van de

extracellulaire matrix (ECM) op een synthetische manier nabootsen. Ze maken het mogelijk om de cellen te organiseren in een driedimensionale architectuur. Eveneens is de aanwezigheid van stimuli noodzakelijk voor de bevordering van de vorming en de groei van het weefsel (11). Afhankelijk van het gewenste weefsel en de beoogde applicatie, zullen de vereisten van het materiaal en zijn eigenschappen verschillen.

Een veel voorkomend materiaal is poly(lactide-co-glycolide) (PLG). PLG's zijn hydrolytisch degradeerbare polymeren die goedgekeurd zijn voor het gebruik in het lichaam door de Food & drug Administration (FDA) (12). Deze polymeren bezitten eveneens een zekere mechanische integriteit (13-14). Door hun hydrofobe karakter is de incorporatie/uitzaaiing van levende cellen een enorme uitdaging.

In dit werk maken we gebruik van hydrogelen. Dit is een klasse van hoog gehydrateerde polymeermaterialen (waterinhoud $\geq 30\%$ g/v) (15) en zijn bijgevolg een geschikt kandidaat biomateriaal. Ze bestaan uit synthetische of natuurlijke hydrofiele polymeerketens. Hun structurele integriteit hangt af van de vernettingsgraad via chemische of fysische interacties tussen de polymeerketens. Hun mechanische en structurele eigenschappen zijn in vele gevallen identiek aan deze van zacht weefsel (16). Hydrogelen hebben verschillende toepassingen in het domein van weefselgeneratie. Ze worden veelvuldig aangewend als 'ruimte vullende agentia' en als afgiftesystemen voor bioactieve moleculen, alsook als driedimensionale structuren die cellen organiseren en stimuli kunnen bevatten die directe weefselregeneratie kunnen bevorderen (17). 'Ruimte vullende agentia' zijn de eenvoudigste groep van draagstructuren en worden gebruikt als biologische lijm, adhesiepreventie, etc ... Ook worden er reeds bioactieve moleculen vrijgesteld uit hydrogeldraagstructuren en dit in verschillende toepassingen, zoals de bevordering van angiogenese en encapsulatie van gesecreteerde cellen. In een laatste toepassing worden hydrogel draagstructuren toegepast voor het transplanteren van cellen en het regenereren van weefsel waaronder kraakbeen, bot en zacht weefsel (18).

I.3.1. Overzicht van natuurlijke hydrogelen en hun toepassing als biomateriaal.

Natuurlijke hydrogelen vinden verschillende toepassingen in het domein van weefselregeneratie, aangezien ze macromoleculaire eigenschappen bezitten die analoog zijn aan de extracellulaire matrix (ECM). Collageen, gelatine, fibrine, alginaat, agarose, chitosan en hyaluronaat vertonen goede *in vivo* biocompatibiliteit en zijn daardoor een geschikte kandidaat voor weefselregeneratie (16, 19).

I.3.1.1. Collageen en gelatine.

Collageen is het hoofdproteïne van de extracellulaire matrix van zoogdierweefsel en omvat 25% van de totale proteïnemassa van de meeste zoogdieren (20-21). Het is het meest wijdverspreide, natuurlijk afgeleide polymeer dat gebruikt wordt voor het herstel van huid, been, pezen en ligamenten (21). Fysisch gevormde collageengelen zijn thermoreversibel en hebben gelimiteerde mechanische eigenschappen. Een oplossing hiervoor omvat de introductie van vernetbare zijgroepen. Collageen kan eveneens vernet worden door gebruik te maken van gluteraldehyde (22) of difenylfosforylazide (23). Echter blijven de mechanische eigenschappen beperkt en bovendien kunnen ze potentieel immunogeen zijn, alsook duur (24). Collageen voldoet aan vele biologische criteria doordat het bestaat uit een specifieke combinatie van aminozuursequenties die herkend worden door cellen en gedegradeerd worden door enzymen die gesecreteerd worden door de cellen (i.e. collagenase). De adhesie van cellen aan collageen kan gewijzigd worden door een chemische modificatie, waaronder de incorporatie van fibronectine, chondroïtinesulfaat of lage hoeveelheden aan hyaluronzuur in de collageenmatrix (25). Collageengelen zijn reeds aangewend voor de reconstructie van lever (26), huid (25), bloedvaten (27) en darmweefsel (28).

Gelatine is een product dat wordt bereid door partiële hydrolyse van collageen. Twee types van gelatine kunnen bekomen worden, afhankelijk van het voorbehandelingsproces en zijn commercieel gekend als type-A gelatine (iso-elektrisch punt bij pH~8-9) en type-

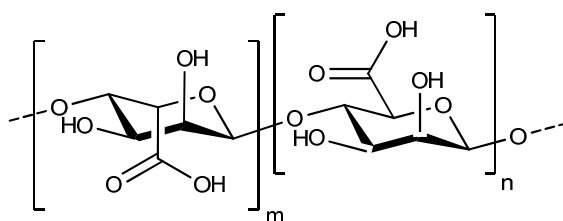
B gelatine (iso-elektrisch punt $\text{pH} \sim 4-5$) bekomen onder zure of basische denaturatie respectievelijk (21).

I.3.1.2. Fibrine.

Fibrine speelt een belangrijke rol in natuurlijk weefselherstel en kent daardoor gebruik als chirurgische lijm (29). Fibrinegelen kunnen geproduceerd worden uitgaande van het bloed van patiënten en kan dus gebruikt worden als een autologe draagstructuur voor weefselregeneratie. Er kunnen in dat geval geen toxische degradatieproducten gevormd worden of inflammatoire reacties verwacht worden uitgaande van het lichaam. Fibrine vormt gelen door een enzymatische polymerisatie van fibrinogeen bij kamertemperatuur in de aanwezigheid van thrombine (30). Fibrinegelen worden ook toegepast voor het herstel van beschadigd spierweefsel (31). Hun gelimiteerde mechanische eigenschappen vormen een belangrijk nadeel waardoor ze voor sommige applicaties niet kunnen toegepast worden.

I.3.1.3. Alginaat.

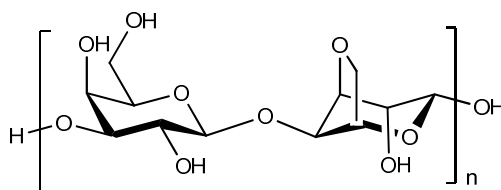
Alginaat (Figuur I.3.2) is een gekend biomateriaal dat bekomen wordt uit bruine algen en wordt wijdverspreid gebruikt voor geneesmiddelafgiftetoepassingen en weefselregeneratie door zijn geschikte biocompatibiliteit, lage toxiciteit, lage kostprijs en eenvoudige gelering in aanwezigheid van divalente kationen zoals Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} en Sr^{2+} . Alginaat kan gebruikt worden als een injecteerbare celdrager (32), alsook voor wondbehandeling, tandheelkundige toepassingen en immobilisatiematrices (33-34). Ondanks zijn gunstige eigenschappen is alginaat zelf geen ideaal materiaal doordat het oplost via de uitwisseling van zijn divalente kationen aan de omgeving. Alginaat is gekend voor zijn proteïne-afstotende eigenschappen en kan bijgevolg niet interageren met cellen (35).



Figuur I.3.2 - Structuurformule van algiinaat.

I.3.1.4. Agarose.

Agarose (Figuur I.3.3) is een ander type van polysaccharide en vormt, in tegenstelling tot algiinaat, thermoreversibele gellen. De voorgestelde gelstructuur wordt gekarakteriseerd door geassocieerde dubbele helices en de junktiezones worden gevormd door meerdere ketenaggregaties. Het polymeer lost op in kokend water en vormt een gel in het temperatuursgebied 35 - 45 °C, afhankelijk van de oorsprong van de agarose. De fysische structuur van de gellen kan in hoofdzaak gecontroleerd worden door gebruik te maken van verschillende agarose-concentraties, hetgeen resulteert in verscheidene poriëngroottes. Om de celinteractie te verbeteren kan men celadhesieve peptiden inbouwen (bv: CDPGYIGSR) (35).

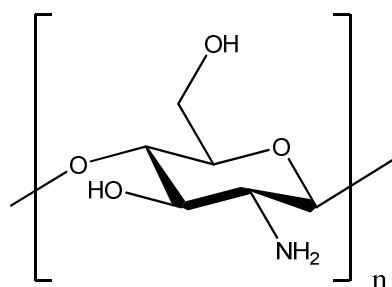


Figuur I.3.3 - Structuurformule van agarose.

I.3.1.5. Chitosan.

Chitosan (Figuur I.3.4) wordt bekomen uit de *N*-deacetylratie van chitine en bevat doorgaans minder dan 40% van *N*-acetyl-D-glucosamine residu's. Chitosan kent vele biomedische applicaties waaronder weefselregeneratie wat te wijten is aan zijn goede biocompatibiliteit, lage toxiciteit, structurele gelijkenis aan natuurlijke glycosaminoglycanen en zijn mogelijke degradatie door enzymen zoals chitosanase en

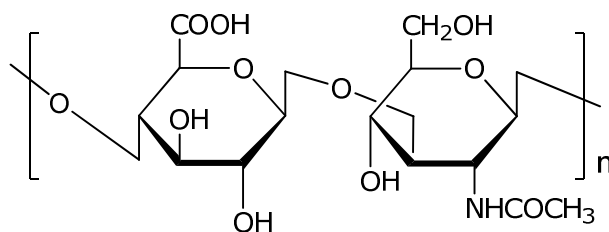
lysozyme (36). Chitosan is oplosbaar in aanwezigheid van een zuur en over het algemeen onoplosbaar onder neutrale condities. Chitosan kan onder meer hydrogelen vormen via ionaire interacties (37) of door chemische vernetting in aanwezigheid van glutaraldehyde (37). Azidegederivatiseerd chitosan is gerapporteerd en kan geleren door UV bestraling (38).



Figuur I.3.4 – Gedeacetyleerde deelstructuurformule van chitosan.

I.3.1.6. Hyaluronaat.

Hyaluronaat (Figuur I.3.5) is één van de glycosaminoglycaan componenten in natuurlijke extracellulaire matrices en speelt een belangrijke rol in wondherstel. Hyaluronaat kan geïncorporeerd worden in hydrogelen via een covalente vernetting met verschillende hydrazidederivaten, alsook door radicale polymersatie na het invoeren van glycidylmethacrylaat op hyaluronzuur (39). Hyaluronaat wordt gedegradeerd door hyaluronidase en serum (40). Hyaluronaat heeft een uitstekend potentieel voor verschillende weefselregeneratietoepassingen zoals artificiële huid (41), intradermale gezichtsimplantaten (42), wondbehandeling (43) en zachte weefselaangroei (42). De lage mechanische eigenschappen van de gelen zijn een belangrijk nadeel, deze hebben de applicaties van hyaluronaat sterk gelimiteerd tot op heden.



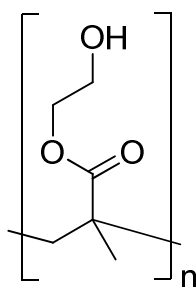
Figuur I.3.5 - Structuurformule van hyaluronaat.

I.3.2. Overzicht van synthetische hydrogelen en hun toepassing als biomateriaal.

Synthetische hydrogelen kunnen een geschikt biomateriaal vormen door hun controleerbare en reproduceerbare eigenschappen. Deze polymeren kunnen namelijk geproduceerd worden met een specifiek moleculair gewicht, een bepaalde architectuur, degradeerbare entiteiten en controleerbare vernettingseigenschappen. Deze eigenschappen zijn op hun beurt verantwoordelijk voor de gelerings-, polymeernetwerk-, mechanische eigenschappen, enz In onderstaande paragrafen wordt een kort overzicht gegeven van de meest voornaamste synthetische hydrogelen.

I.3.2.1. Poly(acrylzuur) en derivaten.

Eén van de meest bestudeerde synthetische hydrogelen is het hydrolytisch stabiel, vernet poly(2-hydroxyethyl methacrylaat), Figuur I.3.6. poly(HEMA) wordt veelvuldig toegepast voor oogheekundige toepassingen zoals contactlenzen (44), alsook voor geneesmiddelaafgifte (45). Macroporeuze poly(HEMA) gelen werden reeds geproduceerd voor weefselregeneratie door cryogene behandeling via uitloggen van porogenen (46). Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) is tevens een geschikt biomateriaal doordat het een fasentransitie ondergaat boven de 'lower critical solution temperature' (LCST). De LCST van PNIPAAm in water bevindt zich rond de 32°C en kan afgestemd worden op lichaamstemperatuur via copolymerisatie (47). NIPAAm werd reeds gecopolymeriseerd met acrylzuur, methacrylzuur en butylmethacrylzuur afhankelijk van de beoogde applicatie (48-50). Een belangrijke limitatie van de gelen is dat ze niet biodegradeerbaar zijn (52).

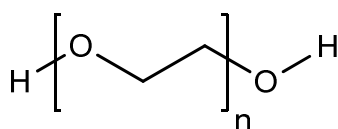


Figuur I.3.6 - Structuurformule van poly(HEMA).

I.3.2.2. Poly(ethyleen oxide) en copolymeren.

Poly(ethyleen oxide) (PEO, Figuur I.3.7) is door de 'Food and Drug administration' (FDA) goedgekeurd voor gebruik in verschillende medische applicaties, dankzij zijn biocompatibiliteit en zijn lage toxiciteit. Het is reeds uitvoerig bestudeerd voor zijn gebruik voor oppervlaktemodificaties (51) van biomaterialen (52) en voor de inductie van celmembraanfusies (53).

Verschillende PEO-gebaseerde copolymeren werden reeds gerapporteerd en voornamelijk gebruikt voor geneesmiddelafgiftetoepassingen (56-58). Een belangrijk PEO-bevattend copolymeer is het triblok copolymeer van PEO en poly(propyleenoxide) (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO), gekend onder de merknaam Pluronic[®] of Poloxameren en is het uitgangsmateriaal dat aangewend wordt in dit werk (zie § I.5. PEO-PPO-PEO blokcopolymeren: Pluronic[®]).

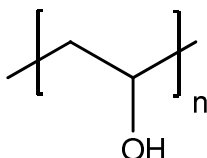


Figuur I.3.7 – Structuurformule van poly(ethyleen oxide).

I.3.2.3. Poly(vinyl alcohol).

Poly(vinyl alcohol) (PVA, Figuur I.3.8) kan bekomen worden uit poly(vinylacetaat). De hydrofiliciteit en de oplosbaarheid van PVA hangt in belangrijke mate af van zijn moleculair gewicht. PVA vormt een hydrogel door o.a. chemische vernetting met

gluteraldehyde (54) of epichloorhydrine (55). Echter, deze gelmethode is niet geschikt voor *in situ* gebruik in het lichaam. Bovendien is PVA niet degradeerbaar in de meeste fysiologische omgevingen (56). PVA hydrogelen zijn reeds aangewend voor de regeneratie van artificeel gewrichtsweefsel (57) en een hybride-type artificele pancreas (58).

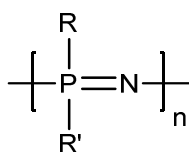


Figuur I.3.8 - Structuurformule van poly(vinyl alcohol).

I.3.2.4. Polyfosfazeen.

Polyfosfazenen zijn een interessant materiaal voor veel biomedische toepassingen aangezien ze degradeerbaar zijn in fysiologische omstandigheden. De degradatiekinetiek kan gestuurd worden door veranderingen in de zijketen, in tegenstelling tot alifatische polyesters, polyanhydriden en poly(ortho-esters) (59). Polyfosfazeen is een anorganisch polymeer (Figuur I.3.9) dat bestaat uit alternerende fosfor- en stikstofatomen met twee zijgroepen aan elk fosforatoom.

Verschillende modificaties van polyfosfazenen werden reeds gerapporteerd waaronder poly(aryl/alkyl fosfazenen) (60), poly[(aminozuur-ester) fosfazenen] (61) en methoxy-poly(ethyleen glycol) gesubstitueerde polyfosfazenen met temperatuursgevoelige eigenschappen (62). Er kunnen twee soorten van hydrogelen bekomen worden uitgaande van polyfosfazenen waaronder ionaire en niet-ionaire.



Figuur I.3.9 – Structuurformule van polyfosfazeen.

I.3.2.5. Polypeptiden.

Proteïnen zijn de hoofdcomponent van de natuurlijke weefselmatrix en genieten daardoor een brede interesse. Een eiwit bestaat uit aminozuren die via peptidebindingen tot een keten gekoppeld zijn. Zo'n keten wordt een polypeptide genoemd. De carbonzuurgroep van een aminozuur kan reageren met de aminogroep van een ander aminozuur, waarbij een watermolecule wordt afgesplitst. Soms bestaat een eiwit uit één polypeptide, soms uit meerdere polypeptiden. In totaal kan een eiwit honderden tot duizenden aminozuren bevatten. Ieder eiwit heeft een kenmerkende driedimensionale structuur die ontstaat omdat de aminozuurketens zich opvouwen en oprollen. De 3D structuur van een eiwit bepaalt in grote mate zijn biologische functie. Voor levende organismen zijn eiwitten onmisbaar. Ze spelen een rol in de stofwisseling, transporteren belangrijke moleculen en verzorgen de communicatie tussen cellen. De structuur van een eiwit kent verschillende niveaus. De primaire structuur is de volgorde waarin de verschillende aminozuren in het polypeptide aan elkaar zijn geregen. De secundaire structuur wordt gevormd door typische structuren van de polypeptideketen, zoals de 'plaat' of de 'helix'. Die zijn vooral het gevolg van de interactie tussen nabijgelegen peptidebindingen. De tertiäre structuur betreft de vouwingen van het eiwit als geheel. Die ontstaan door de interactie tussen de restgroepen van verschillende aminozuren. Deze kunnen soms ver uit elkaar liggen in de polypeptideketen. Eiwitten die zijn opgebouwd uit meerdere polypeptideketens kennen nog een quaternaire structuur. Dit is de manier waarop verschillende polypeptideketens samenclusteren en zo één eiwit vormen (63-65). Synthetische polypeptiden worden voornamelijk bereid door gebruik te maken van de ring-openingspolymerisatie (ROP) van α -aminozuur *N*-carboxyanhydrides. Een groot aantal polypeptiden en copolypeptiden kan gesynthetiseerd worden uitgaande van verschillende combinaties van aminozuren (65).

I.3.3. Criteria voor hydrogeleigenschappen als draagstructuur voor weefselregeneratie.

Bij de keuze van een geschikte hydrogel dient er rekening gehouden te worden met de fysische eigenschappen, de massatransporteigenschappen en de biologische interacties (66). Deze variabelen zullen gedetermineerd worden door de beoogde toepassing. Draagstructuren die ontworpen zijn voor celencapsulatie dienen in staat te zijn om een gel te vormen zonder dat ze de cellen schade berokkenen. Tevens mogen ze na geling niet toxisch zijn voor de cellen en het omringende weefsel en moeten ze diffusie van nutriënten en metabolieten toelaten. Daarenboven dient een draagstructuur voldoende mechanische integriteit te bezitten om implantatie toe te laten (67). De biologische eigenschappen zullen in een belangrijke mate afhangen van de (a)toxiciteit.

I.3.3.1. Fysico-chemische eigenschappen van een hydrogel voor weefselregeneratie.

Biomaterialen die aangewend worden voor weefselregeneratie hebben als doel om de ruimte op te vullen die voorheen ingenomen werd door natuurlijk weefsel (66). In deze optiek zullen de fysische eigenschappen inherent zijn voor het ontwerp van een draagstructuur. De specifieke fysische eigenschappen omvatten gelvormingsmechanismen, mechanische eigenschappen en degradatie-eigenschappen. Bij hydrogelen worden deze eigenschappen beïnvloed door de intrinsieke eigenschappen van de hoofdketen en de graad van vernetting.

Gelvormingsmechanismen dicteren hoe moleculen en cellen mogelijks geïncorporeerd kunnen worden in een draagstructuur. Zo kunnen bijvoorbeeld bepaalde fabricatiemethoden en condities (temperatuurstoename, pH verandering, solvent, ...) zorgen voor proteïnedenaturatie (68) en kunnen deze de cellen beschadigen of zelfs doden (20). Een manier om dit aspect te omzeilen bestaat erin om eerst het materiaal te creëren en dan pas de bioactieve moleculen en cellen te incorporeren.

Een alternatieve uitdaging vormt de mogelijkheid om cellen met polymeren te mengen. Injecteerbare, *in vivo* gelerende vormen van alginaat (74-77), chitosan (37) en

poly(propyleen fumarate-co-ethyleenglycol) (69-70) werden reeds succesvol gecombineerd met cellen en/of bioactieve moleculen, gevolgd door een invasieve toepassing.

Op macroscopische schaal moet de draagstructuur de nodige ondersteuning bieden aan het regenererende weefsel en dient het zijn volumevullende functie te bewaren. Op microscopisch niveau zullen celadhesie (en differentiatie) afhangen van onder andere de mechanische invloed op de cellen (80-83). Adequate mechanische eigenschappen van een draagstructuur kunnen uitgedrukt worden in elasticiteit, samendrukbaarheid, visco-elasticiteit, treksterkte en breuk. Voor hydrogelen zullen deze eigenschappen beïnvloed worden door het type netwerk, zijn vernettingskarakteristieken, de geleringscondities (bv temperatuur en pH), zwelling en degradatie (71). De mechanische eigenschappen van hydrogelen worden ook bepaald door het gebruikte type vernetter en zijn concentratie. De mechanische sterkte van ionair vernette alginaat hydrogelen neemt toe met toenemende ionenconcentratie of wanneer tweewaardige ionen worden gebruikt met een hogere affiniteit voor alginaat (72). Zo zal ook de afschuivingsmodulus van covalent vernet alginaat afhangen van de vernettingsdichtheid (73). Een toename van de zwelling resulteert in een afname van de mechanische sterkte van de hydrogelen (79, 84, 87). Hydrogeldegradatie zal leiden tot een verzwakking van de gellen (87-88), tenzij de weefselingroei deze simultaan versterkt (74). De beoogde degradatiekinetiek voor een draagstructuur zal afhangen van de specifieke toepassing aangezien de degradatie een essentiële rol vervult. In de meest ideale situatie dient de snelheid van degradatie het spiegelbeeld te zijn van de snelheid waarmee nieuw weefsel gevormd wordt. Bij hydrogelen onderscheiden we twee basis degradatiemechanismen:

- hydrolytische degradatie
- enzymatische degradatie

De meeste synthetische hydrogelen worden gedegradéerd door hydrolyse van de esterbindingen (cfr. methacrylaten) (78, 89-90). Collageen, hyaluronzuur en chitosan

worden allen enzymatisch gedegradeerd (18, 91-93). De snelheid van de enzymatische degradatie zal afhangen van het aantal beschikbare 'splittingsites' in het polymeer en van de hoeveelheid enzymen aanwezig in de omgeving van de draagstructuur (94-95). Ionair vernet alginaat kan heroplossen (75) maar kan tevens gecontroleerde hydrolyse ondergaan na partiële oxidatie (76). De snelheid van heroplossen van ionair vernet alginaat hangt af van de ionaire omgeving waarin de draagstructuur is geplaatst (75).

Bij de ontwikkeling van draagstructuren voor weefselregeneratie is het van belang om het transport van gassen, nutriënten, proteïnen, cellen en afvalproducten doorheen de draagstructuur nader te bestuderen.

Het belangrijkste aspect van massatransport is diffusie. In een draagstructuur zal de snelheid en de afstand die een molecule diffundeert afhangen van het materiaal, de moleculaire karakteristieken en interacties. Gelkarakteristieken zoals polymeerfracties, polymeerdimensies en de concentratie aan vernetter, zullen de nanoporeuze structuur van een gel bepalen (85, 97). Bijgevolg zullen diffusiesnelheden beïnvloed worden door het moleculair gewicht en de grootte van de diffusieproducten (gedefinieerd door Stokes radii) in vergelijking met de poriën. Moleculen zoals glucose, zuurstof en vitamine B12 met moleculaire gewichten kleiner dan 1300 g/mol en een Stokes radius kleiner dan 1 nm kunnen vrij diffunderen doorheen een ionair vernette alginaat microsfeer (98-99). Hogere moleculaire gewichtsderivaten zoals myoglobine, albumine en fibronectine, hebben niet de mogelijkheid om vrij te diffunderen. De snelheid van diffusie wordt verder verlaagd door een toename in de alginaatconcentratie. De diffusiesnelheid van moleculen in gluteraldehyde vernet chitosan daalt eveneens indien de vernettingsconcentratie toeneemt (37). Voor alginaat en andere geladen moleculen zal de diffusiesnelheid van geladen moleculen niet alleen grootte-afhankelijk zijn (72, 77), maar zullen ze tevens beïnvloed worden door eventuele ladingsinteracties met de geladen (alginaat)ketens.

Tenslotte, de vereisten inzake diffusie en de daaruit voortvloeiende materiaalkeuze, zal afhangen van de beoogde toepassing. In het geval van zowel kleine als grote moleculen, zal een vrije diffusie uit de draagstructuur prioritair zijn (78). Het verbeteren van de

zuurstoftoevoer alsook de instroom van nutriënten en het verwijderen van afvalproducten zijn essentieel voor de celviabiliteit.

I.3.3.2. Celbiologische functies van een hydrogel voor weefselregeneratie.

De aangewende hydrogelmaterialen dienen in het lichaam simultane cellulaire functies te stimuleren (adhesie, proliferatie, differentiatie) en dienen in staat te zijn om weefselregeneratie te bevorderen. Ondertussen mag er geen chronische inflammatoire respons optreden. Hydrogelen dienen atoxisch te zijn voor de cellen die ze encapsuleren, alsook voor het omringende weefsel. Vele hydrogelen zijn atoxisch en zullen dus geen actieve chronische immuunrespons uitlokken, maar zullen ook de cellulaire adhesie niet promoten. Met uitzondering van collageen (i.e. natuurlijk proteïne van de ECM), hebben de meeste cellen geen receptoren voor hydrogelen en zullen bijgevolg niet adheren. Bovendien zullen door het hydrofiele karakter van de hydrogelen, ECM proteïnen zoals laminine, fibronectine en vitronectine niet absorberen aan het geloppervlak (79). Een veelvuldig toegepaste methode voor de ontwikkeling van specifieke adhesieoppervlakken is het covalent koppelen van een ECM proteïne (79-80) of een peptidesequentie die het mogelijk maken om de cel via een receptor (79, 81-82) te binden aan het polymeer. De meest gebruikte aminozuursequentie is arginine-glycine-asparaginezuur (i.e. Arg-Gly-Asp, RGD), welke afgeleid is van verschillende ECM proteïnen waaronder fibronectine, laminine, vitronectine en collageen (79). De meeste celtypes kunnen binden aan RGD. Zowel alginaat (82-83) als PEG (81, 84-85) worden reeds gemodificeerd met deze peptiden voor de bevordering van de cellulaire adhesie. Eveneens werden adhesieproteïnen, peptiden, groeifactoren (en groeifactor afgeleide peptides) reeds covalent gebonden aan hydrogelen. 'Transforming' groeifactor- β (TGF- β) werd reeds gekoppeld aan PEG voor de bevordering van de productie van de ECM van spierweefsel (84). Tevens werd een oligopeptide afgeleid van het been morfogenetisch proteïne-2 (BMP-2) covalent gebonden aan alginaat voor de promotie van osteoblastmigratie in gellen en calcificatie van de draagstructuren (86). Verschillende factoren kunnen geïncorporeerd worden in de hydrogelen voor de manipulatie van weefselvorming (87).

I.4. Intergeconnecteerde 3D hydrogel draagstructuren via 'rapid prototyping'.

Het gecombineerd gebruik van hydrogelen en 'rapid prototyping' technieken in het domein van weefselregeneratie kende de afgelopen decennia een toenemende belangstelling (88-91) en zijn een elegant hulpmiddel voor de productie van draagstructuren. Het voordeel is dat men een volledig interconnectieve driedimensionale structuur kan bekomen met vooraf bepaalde parameters. Eén van de belangrijkste nadelen van een hydrogel is zijn gebrek aan mechanische sterkte. Hierdoor zal het behouden en het verbeteren van de mechanische integriteit van de bekomen draagstructuren een belangrijk aandachtspunt vormen.

I.4.1. De multidisciplinaire noden van een biomimetische draagstructuur.

Vanuit een celbiologisch perspectief zullen 2D celcultuurmodellen zorgen voor fysiologisch gecompromitteerde cellen, geïnduceerd door een onnatuurlijke omgeving (92). *In vivo* ondergaan de cellen een 3D groei en complexe cel-cel interacties (93). Dit paradigma zorgde voor een verschuiving van conventionele 2D celcultuur naar een 3D micro-omgeving (94). Om een meer realistisch begrip te creëren van cel-cel en cel-biomateriaal interacties stelde Kirkpatrick et al (95) het gebruik voor van *in vitro* co-cultuur modellen voor. Een eerste veronderstelling omvat het aspect dat cellen nood hebben aan een ondersteunend 3D biomateriaal dat tracht om de extracellulaire matrix (94, 96) nauwgezet te reproduceren. Via deze aanpak zal het biomateriaal de cellen leiden en ondersteunen. Een tweede aspect vindt zijn oorsprong in de hypothese dat cellen beschikken over een aanzienlijk potentieel om zich te organiseren door cel-cel interacties. Hierbij wordt verwezen naar de zogenaamde draagstructuurvrije weefselregeneratie (97). Daar waar de voormalige theorie het belang van een ondersteunende structuur zal maximaliseren als celondersteunend materiaal, staat hier het potentieel van zelfassemblage voorop. Draagstructuren kunnen aanzien worden als 'ECM mimics' met twee doelstellingen (91, 98):

- (i) het definiëren van een ruimte welke vorm geeft aan het regenererend weefsel
- (ii) tijdelijke substitutie van weefselfuncties

Het is duidelijk dat het ontwerp van de draagstructuur dient te beantwoorden aan een aantal noden om aan deze doelstellingen te voldoen, waaronder (91, 98-101):

- hoge porositeit (bij voorkeur 100% interconnectief om optimale nutriënten/afvalstroom en weefselingroei toe te laten)
- relevante geometrie en poriëngrootte (5 tot 10 keer de celdiameter)
- biodegradeerbaar met stuurbare degradatietijd
(enzymatisch of niet-enzymatische, hydrolytische degradatie)
- stuurbare mechanische eigenschappen
- geschikte cel-biomateriaal interacties
- eenvoudig te produceren

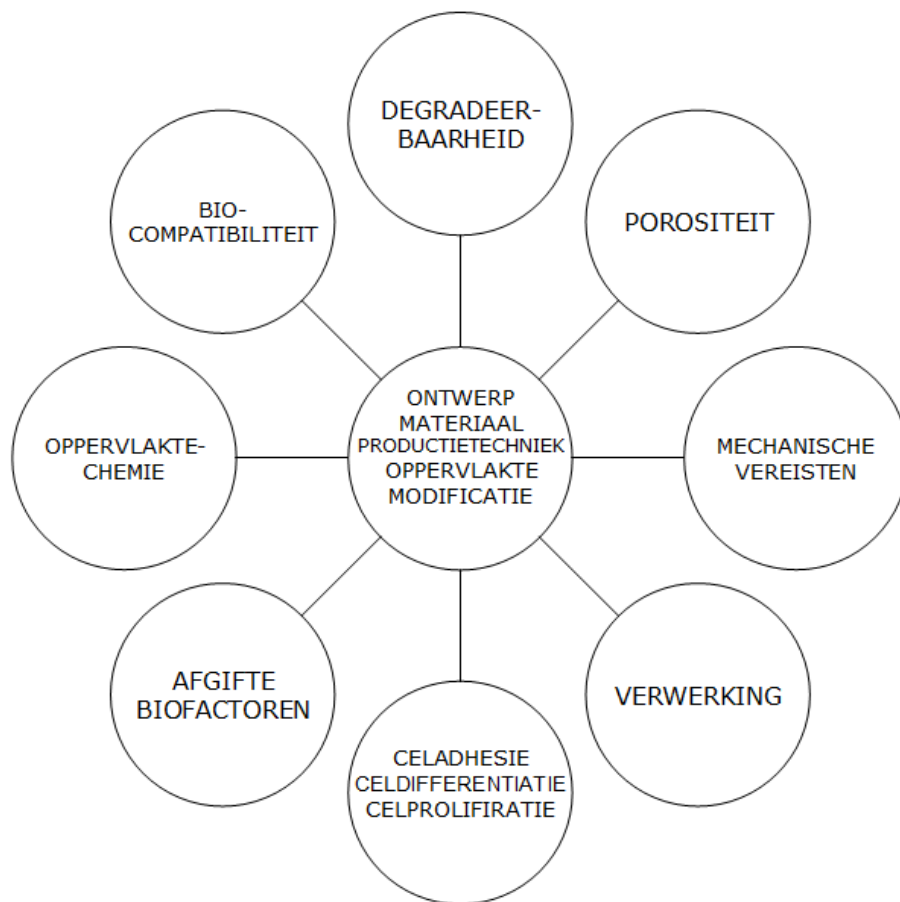
Weefselregeneratie vereist biomaterialen die celinteracties uitlokken (cfr. bioactiviteit) (102). Controle over de bioactiviteit kan bereikt worden door de incorporatie van groeifactoren (103), enzymatische herkenningspunten (104), adhesiefactoren of materiaalwijzigingen. Materiaalmodificaties zijn een algemeen begrip dat kan slaan op bulkwijzigingen (12, 102) of oppervlaktemodificaties (118, 121-122). De fysische en chemische eigenschappen beslaan de levensduur van het implantaat (105), terwijl de wijzigingen aan de oppervlaktechemie zich reflecteren op de cel-weefsel interacties (105-106).

Conventionele fabricatiemethoden kunnen als volgt ingedeeld worden:

- uitloging (125-128)

- gasschuimen (127-131)
- vezelnetwerking (131-132)
- fasenseparatie (107-108)
- smeltgieten (135-136)
- emulsievriesdrogen (137-138)
- oplossingsgieten (109-110)
- vriesdrogen (111-113)
- combinaties van technieken

Klassieke benaderingen worden gedefinieerd als processen die draagstructuren creëren met een continu, ononderbroken poriënnetwerk. Echter hebben ze een gebrek aan interconnectiviteit (101). Andere gerapporteerde nadelen omvatten hun zwakke mechanische eigenschappen, hun beperkte porositeit, het onvermogen voor een ruimtelijke poriëndistributie (interne kanalen) en de beperkte controle over de externe geometrie (114)(9, 111). Bovendien zal de consumptie van organische solventen bij bepaalde methoden gedurende de verwerking aanzien worden als een tweede substantieel nadeel naast de eerder vermelde architecturale nadelen. De aanwezigheid van residuele organische solventen kan een belangrijke invloed hebben op de toxiciteit en de carcinogene effecten op de cellen (101). Ondanks de vele aanpassingen over de jaren is het ontwerp van draagstructuren afhankelijk gebleven van klassieke benaderingen. Een ontwerp-afhankelijke methode opent meer mogelijkheden, welke bekomen kunnen worden door 'rapid prototyping' technieken. In Figuur I.4.1 worden schematisch de complexe multidisciplinaire noden van een draagstructuur weergegeven.



Figuur I.4.1 - Schematische illustratie die de complexe multidisciplinaire noden van een draagstructuur integreert.

I.4.2. Controle van de interne en de externe geometrie van een draagstructuur.

'Solid freeform fabrication' (SFF) is een algemene term die de technieken omvat welke toelaten objecten te produceren door een sequentiële levering van energie en materiaal. Wanneer een snelle productie van een prototype of een afgewerkt product wordt nagestreefd, dan worden deze respectievelijk 'rapid prototyping' (RP) en 'rapid manufacturing' (RM) genoemd. Door middel van 'rapid prototyping' zal een computer op een gecontroleerde manier, via een laagsgewijs proces een draagstructuur genereren. 3D computermodellen bepalen de externe vorm. Deze modellen kunnen ontwikkeld worden door een CAD-softwarepakket of door het modelleren van beeldgegevens (via CRI, MRI). De interne architectuur wordt gedetermineerd door het verwerken van de CAD-data naar een STL bestand, waarna vervolgens de STL data in laagjes worden gereduceerd (cfr. het

genereren van de machineparameters). Dit geeft onmiddellijk één van de belangrijkste aspecten van RP weer, namelijk de directe productie van een draagstructuur met een complexe en patiëntspecifieke, externe geometrie in combinatie met een nauwgezette controle over de interne architectuur welke gelimiteerd is door de resolutie van het systeem (110-111, 144). Andere voordelen omvatten de hoge graad van interconnectiviteit, de mogelijkheid om heterogene materialen te gebruiken, een hoge mate van automatisering, een beperkt aantal procesbewerkingsstappen en een superieure kosten-baten verhouding (99, 115). Er bestaan zowel directe als indirecte RP methoden waarbij de draagstructuur respectievelijk direct geproduceerd wordt uitgaande van een biomateriaal of met behulp van een mal. Wereldwijd worden er meer dan 30 verschillende RP technieken toegepast in de meest diverse industrieën (116). Ongeveer een twintigtal van deze worden toegepast in de biomedische wereld. Ondanks de brede diversiteit van RP technologieën, zijn er slechts een aantal die geschikt zijn voor de verwerking van hydrogelen.

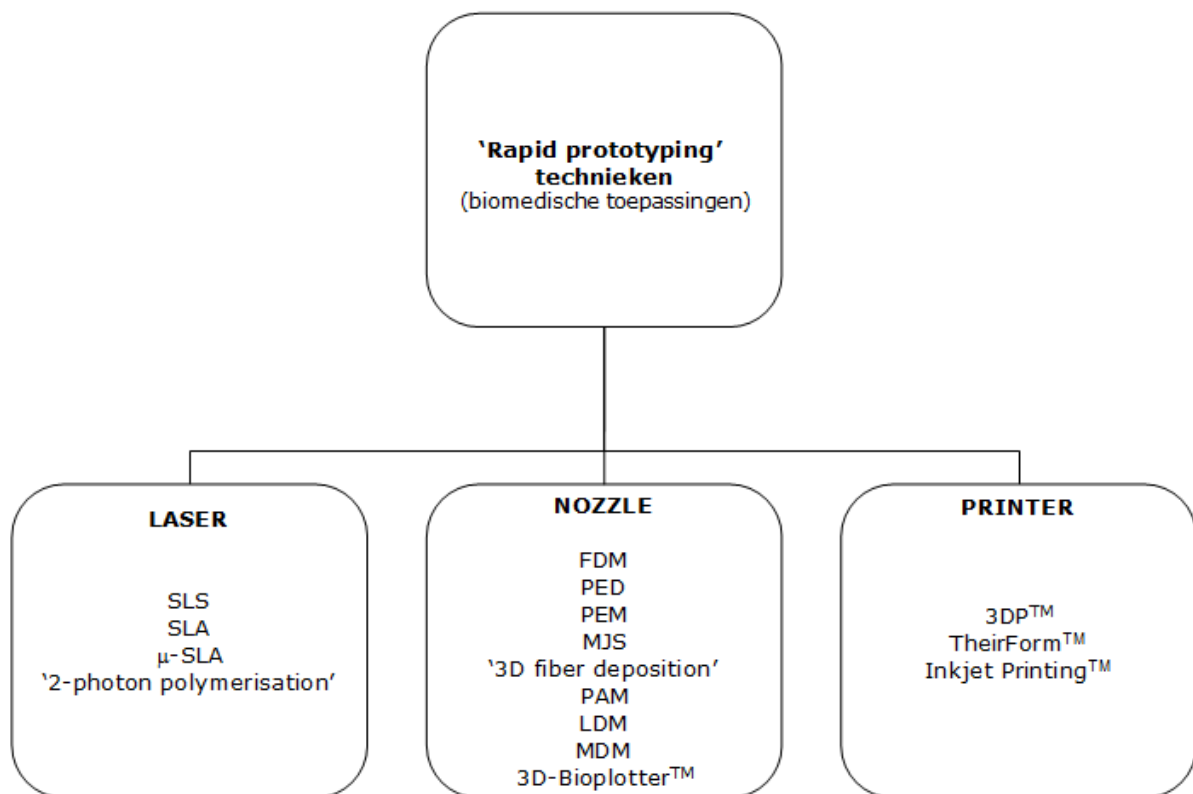
I.4.3. Klassificatie van 'rapid prototyping' technieken voor de verwerking van hydrogelen.

Een eerste onderverdeling van de SFF ondersteunende technieken voor biomedische toepassingen berust op volgende werkingsprincipes:

- (i) laser-gebaseerde
- (ii) nozzle-gebaseerde
- (iii) printer-gebaseerde

Laser-gebaseerde systemen zullen via een fotopolymerisatieproces een vernette draagstructuur produceren. Prepolymeren welke door extrusie/dispersie verwerkt worden omvat de tweede klasse van RP systemen. De printer-gebaseerde toepassingen werken met poeders en depositie van een 'binder' die de deeltjes samenhoudt of via een directe depositie van materiaal door het gebruik van inkjet-technologie. Een belangrijke

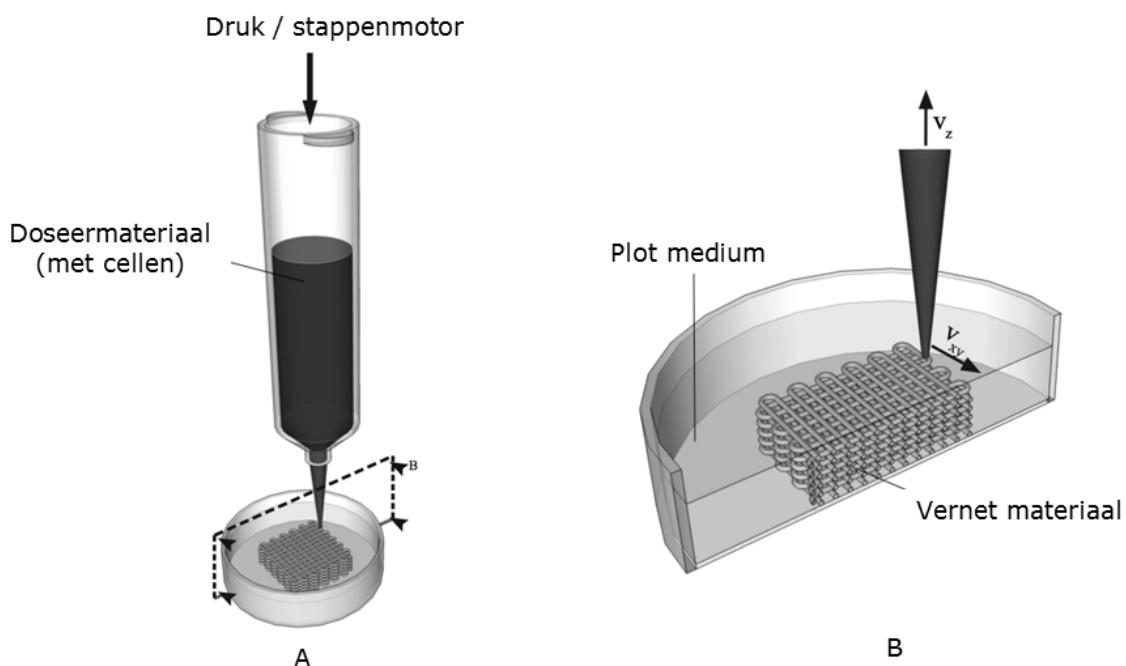
karacteristiek van iedere techniek is de resolutie. Iedere productietechniek wordt belemmerd door zijn laagste technische limiet om de kleinste details te produceren. Niet alle RP technieken zijn toepasbaar voor het verwerken van hydrogelbouwstenen. Figuur I.4.2 klassificeert de verschillende RP technieken die aangewend kunnen worden voor biomedische toepassingen. De productie van hydrogeldraagstructuren vereist milde verwerkingscondities.



Figuur I.4.2 - Klassificatie van 'rapid prototyping' technieken met biomedische toepassingen in laser-, nozzle-, en printerbaseerde systemen.

In dit werk focussen we ons enkel op de 3D-bioplotter technologie. Het doseringsproces weergegeven in Figuur I.4.3. werd geïntroduceerd door Landers en Mülhaupt in 2000 in het 'Freiburg Research Centre' (117). De driedimensionale constructie van objecten gaat door in een laminaire wijze door een computergecontroleerde depositie van het materiaal. De dispensiekop beweegt in drie dimensies boven een stationair platform. Het is aldus mogelijk om een continue dispensie van microstrengen of een discontinue dispensie van micropartikels te produceren. Een

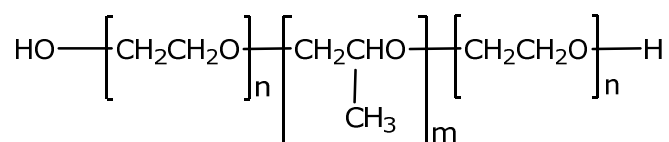
vloeistofstroom wordt gegenereerd door het toepassen van gefilterde luchtdruk (cfr. pneumatische 'nozzle') of door gebruik te maken van een stappenmotor (cfr. 'volume-driven injection (VDI) nozzle'). De mogelijkheid om een viskeus materiaal in een waterige vloeistof met een passende dichtheid te plotten is een belangrijke eigenschap van dit proces. In dit opzicht zijn laag viskeuze materialen hierbij voordelig. In dit productieproces kunnen thermogevoelige biocomponenten verwerkt worden, alsook cellen. Vernettingsreacties kunnen uitgevoerd worden door het plotten in een co-reactief medium of via een tweecomponentendispensiemechanisme door het gebruik van zogenaamde 'mixing nozzles'. De dikte van de struts kan gemoduleerd worden door variatie van de viscositeit, de depositiesnelheid (cfr. snelheid in het planaire veld), de 'tip' diameter en de aangebrachte druk. Constructies die opgebouwd worden door deze plottechniek hebben in vele gevallen gladde 'strut' oppervlakken, welke niet wenselijk zijn met betrekking tot celadhesie (98). Onlangs is er het 4D bioplotten ontstaan waarbij 'tijd' is geïntegreerd met het 3D plotten als vierde dimensie (118). Hierbij kunnen de bekomen structuren veranderen van vorm of van functionaliteit door een externe impuls.



Figuur I.4.3 - Schema van het 3D bioplotter dispensie principe.

I.5. PEO-PPO-PEO blokcopolymeren: Pluronic®.

Copolymeren worden gesynthetiseerd door een willekeurige polymerisatie van meer dan één monomeertype. Het resultaat van zo een synthese noemt men een blokcopolymeer indien de individuele monomeren optreden als blokken. De verschillende types blokken van het copolymeer zijn meestal incompatibel met elkaar. Indien amfifiele blokcopolymeren in water opgelost worden, kunnen deze zich associëren in microstructuren die lijken op micellen welke gevormd worden in aanwezigheid van surfactantia. Wateroplosbare triblokcopolymeren van poly(ethyleen oxide) (PEO) en poly(propyleenoxide) (PPO, Figuur I.5.1) (i.e. PEO-PPO-PEO of $(EO)_{n1}(PO)_m(EO)_{n2}$) zijn commercieel beschikbare, niet-ionaire macromoleculaire oppervlakteactieve producten. Variatie van de copolymeercompositie (PPO/PEO ratio) en zijn molecuulair gewicht (PEO en PPO blok lengte) gedurende de synthese geeft aanleiding tot de productie van macromoleculen met specifieke eigenschappen.



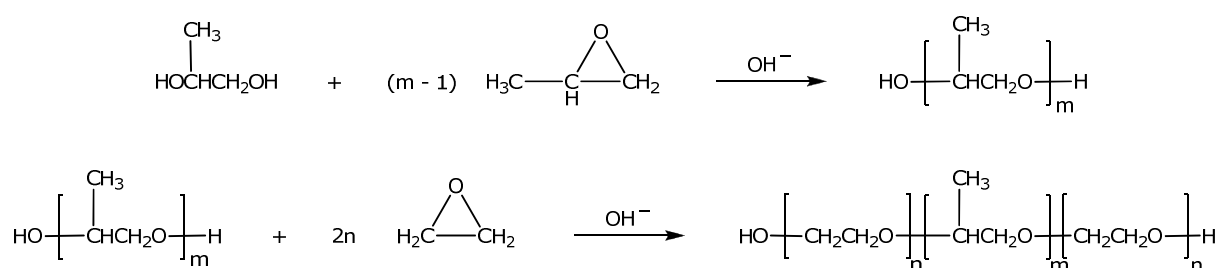
Figuur I.5.1 - Algemene chemische structuur van Pluronic® triblokcopolymeren.

Dit heeft als gevolg dat PEO-PPO-PEO blokcopolymeren een belangrijke klasse van surfactantia vormen welke aangewend worden voor verschillende industriële toepassingen (119-121) waaronder; detergenten, dispersiestabilisatoren, schuimmiddelen, emulgatoren, smeermiddelen, oplosmiddelen, verdikkingsmiddelen in de formulatie van cosmetica (122) en inkten (123-124). Meer specifieke toepassingen omvatten de oplosbaarheid van geneesmiddelen voor gecontroleerde afgifte (125-129), wondenbehandeling (130-132), 'bioprocessing' (i.e. het beschermen van micro-organismen tegen mechanische schade) (154-155) en fase-separatie (cfr. oplossen van organische producten in een waterige fase). Commerciële namen voor deze surfactantia

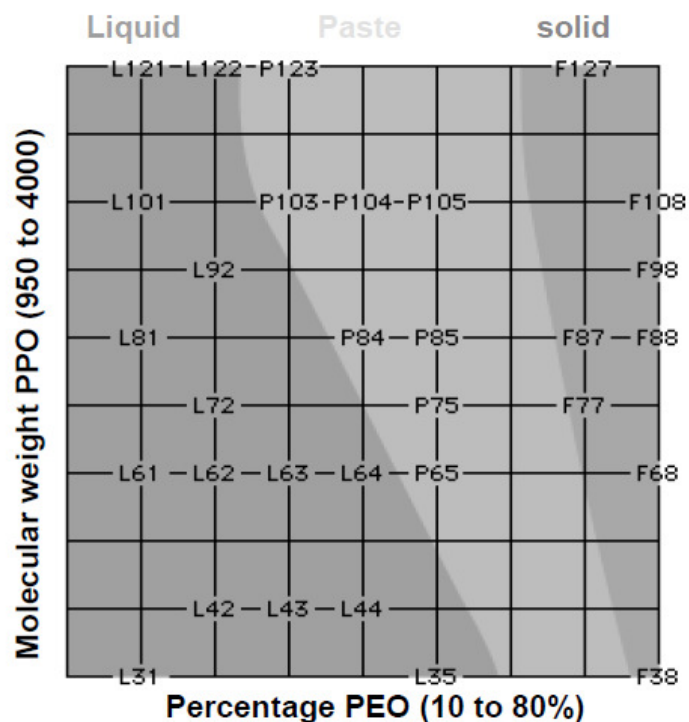
zijn Poloxamers (cfr. geproduceerd door ICI) en Pluronics® (cfr. geproduceerd door BASF). Pluronics® hebben een zeer lage toxiciteit, zijn smaakloos en veroorzaken geen huidirritatie.

Pluronics® worden ingedeeld in het segment van de niet-ionaire, hydrofobe associërende tensio-actieve stoffen. Ze hebben hun oppervlakte actieve eigenschappen te danken aan hun amfifiel karakter waardoor ze zich kunnen positioneren in de interfase en zodoende de oppervlaktespanning kunnen verlagen. De aanwezigheid van poly(ethyleen oxide) is verantwoordelijk voor de oplosbaarheid van deze polymeren in water bij kamertemperatuur. Echter, wanneer de temperatuur wordt opgedreven, stijgt de χ -parameter van het poly(propyleenoxide)blok gradueel. Deze parameter, waarvan gebruik gemaakt wordt in de Flory-Huggins theorie, geeft de interactie weer tussen het polymeer en het solvent. Deze geobserveerde stijging in functie van de temperatuur is een weerspiegeling van het feit dat water wisselt van een goed naar een slecht solvent voor de PPO segmenten bij toenemende temperatuur (133-134). Dit betekent dat enkel boven een bepaalde kritische miceltemperatuur (CMT), micellen gevormd worden bestaande uit Pluronic® surfactantia. Deze micellen zijn opgebouwd uit een hydrofobe PPO kern en een hydrofiele PEO corona. Een tweede typerende temperatuur is de 'cloud point' (CPT) temperatuur. Deze "Lower Critical Solution Temperature" (LCST) staat voor de macroscopische fasenseparatie van de systemen opgelost in water met turbiditeit tot gevolg. Zowel de CMC, de CMT als de CPT zijn afhankelijk van de chemische samenstelling van de Pluronics®, het totale moleculaire gewicht en de molaire ratio tussen PPO en PEO.

De PEO-PPO-PEO triblokcopolymeren worden gesynthetiseerd door een sequentiële additie van propyleenoxide (PO) en ethyleenoxide (EO) aan een laag moleculair gewicht en wateroplosbaar propyleenglycol. De oxyalkylatiestappen worden uitgevoerd in aanwezigheid van een alkalische initiator, meestal natrium- of kaliumhydroxide. De katalysator wordt dan geneutraliseerd en verwijderd uit het uiteindelijke product (121).



De Pluronic® PEO-PPO-PEO blokcopolymeren zijn beschikbaar in verschillende moleculaire gewichten en PPO/PEO compositie verhoudingen (121, 135). Een klassificatie van commercieel beschikbare Pluronics® is weergegeven in Figuur I.5.3. De schrijfwijze van Pluronic® triblokcopolymeren begint met de letter L 'liquid' voor vloeistoffen, P 'paste' voor pasta's of F 'flakes' voor vlokken. Het eerste van de twee cijfers zijn indicatief voor het moleculair gewicht van de PPO-blok terwijl het laatste cijfer voor de gewichtsfractie van het PEO blok staat. Als het eerste getal (eerste twee cijfers in een drie-cijferige code) vermenigvuldigd wordt met 300, dan bekomt men benaderend het moleculair gewicht van het polypropyleenoxidesegment (verticale as van het raster). Indien het laatste cijfer van de Pluronic® code vermenigvuldigd wordt met 10, wordt het gewichtspercentage aan polyethyleenoxide ten opzichte van de globale molecuulmassa (horizontale as) bekomen.



Figuur I.5.3- Klassificatie systeem van commercieel beschikbare Plurronics® (135).

Bovenstaande omschrijving wordt toegelicht aan de hand van volgend voorbeeld: Pluronic® P104 en F108 hebben hetzelfde moleculaire gewicht aan PPO (ongeveer 3000 g/mol), maar P104 bevat 40% (g/g) PEO terwijl F108 80% (g/g) PEO bevat.

De hydrofobiciteit van de blokcopolymeren speelt een grote rol tijdens het micelvormingsproces. De HLB-waarde (hydrofiele-lipofiele balans) wordt aangegeven door de volgende empirische vergelijking:

$$HLB = -36 \frac{m}{2n + m} + 33 \quad [I.1]$$

waarin n en m staan voor het aantal structuureenheden in respectievelijk het PEO- en het PPO-segment. Copolymeren met verschillende m en n waarden worden gekarakteriseerd door HLB waarden gaande van 1 tot en met 30. Hoe hoger deze waarde, des te groter de drijvende kracht om micellen te vormen. De ontmengingstemperatuur, gedefinieerd als de temperatuur waarboven de copolymeren

niet meer oplosbaar zijn in het solvent (i.e. water), varieert van 10 tot 100°C afhankelijk van het PEO-gehalte. Pluronics® met een hoger PEO gehalte vertonen veelal een hogere ontmengingstemperatuur.

Verschillende Pluronic® PEO-PPO-PEO blokcopolymeren zijn weergegeven in Tabel I.5.1 (135). Het 'cloud point' (i.e. de temperatuur waarbij de copolymeren een fasenseparatie ondergaan in water) varieert van circa 10°C voor copolymeren met een laag PEO-gehalte en tot boven 100°C voor copolymeren met een hoog PEO-gehalte. De oplossingssnelheid neemt af als het moleculair gewicht van het copolymeer toeneemt voor Pluronics® met dezelfde PPO/PEO samenstelling (121). Dit kan men verklaren op basis van de Flory-Huggins (134) theorie, waarbij polymeren met een hoog moleculair gewicht een lagere oplosbaarheid hebben ten opzichte van polymeren met een laag moleculair gewicht.

Tabel I.5.1 – Fysische eigenschappen van frequent toegepaste Pluronics®.

A	B	C	D	E	F	G	H
L35	1900	50	7	375	49	73	18-23
F38	4700	80	48	260	52	>100	>24
L42	1630	20	-26	280	46	37	7-12
L43	1850	30	-1	310	47	42	7-12
L44	2200	40	16	440	45	65	12-18
L62	2500	20	-4	450	43	32	1-7
L63	2650	30	10	490	43	34	7-12
L64	2900	40	16	850	43	58	12-18
P65	3400	50	27	180	46	82	12-18
F68	8400	80	52	1000	50	>100	>24
L72	2750	20	-7	510	39	25	1-7
P75	4150	50	27	250	43	82	12-18
F77	6600	70	48	480	47	>100	>24
P84	4200	40	34	280	42	74	12-18
P85	4600	50	34	310	42	85	12-18
F87	7700	70	49	700	44	>100	>24
F88	11400	80	54	2300	48	>100	>24

F98	13000	80	58	2700	43	>100	>24
P103	4950	30	30	285	34	86	7-12
P104	5900	40	32	390	33	81	12-18
P105	6500	50	35	750	39	91	12-18
F108	14600	80	57	2800	41	>100	>24
L122	5000	20	20	1750	33	19	1-7
P123	5750	30	31	350	34	90	7-12
F127	12600	70	56	3100	41	>100	18-23

- (A) Copolymeer
 (B) Gemiddeld moleculair gewicht
 (C) %PEO (g/g)
 (D) Smeltpunt (°C)
 (E) Viscositeit (Brookfield, cps, vloeistoffen bij 25°C, pasta's bij 60°C, vaste stoffen bij 77°C)
 (F) Oppervlaktespanning bij 0.1% (v/v), 25°C (dyn cm⁻¹)
 (G) Cloud point in waterige 1% (g/g) oplossingen (°C)
 (H) HLB (hydrofiele-lipofiele balans)

I.5.2. De thermoreversibele gelering van Pluronic® in water.

LCST systemen kunnen enkel bekomen worden door het vormen van hydrofobe interacties (136). Bij lage temperatuur vormen ze een homogene oplossing, bij opwarming kan er voor bepaalde systemen en onder bepaalde omstandigheden, aggregatie van de hydrofobe groepen optreden waardoor deze een fasenseparatie ondergaan en een hydrogel vormen.

Hoge concentraties van Pluronic® F127 copolymeeroplossingen vertonen een dramatische verandering in viscositeit bij omgevingstemperatuur, wat resulteert in een thermoreversibele gelering (137-141). Dit fenomeen vindt plaats bij een temperatuurstoename van Pluronic® F127 oplossingen (15 tot 30% (g/g)). Indien een gekoelde Pluronic® F127 oplossing bij fysiologische temperatuur wordt gebracht, zal onmiddellijk gelvorming plaatsvinden. De geleringstemperatuur van Pluronic® F127 ligt aanzienlijk lager dan de andere Pluronic® types en is bijgevolg zeer gegeerd voor biomedische toepassingen.

De oorzaak van dit fysisch fenomeen is terug te vinden in de stapeling van de polymere micellen in een kubisch kristalrooster door het overschrijden van een

limietwaarde in de micellaire volume fractie (ϕ_m), waardoor een intensieve verstrengeling van de micelcorona's onvermijdelijk wordt (142).

Verschillende mechanismen zijn reeds voorgesteld als drijvende kracht voor deze thermische gelling. Rassing en Attwood (143) relateerden de geltransitie aan intrinsieke veranderingen in de micellaire eigenschappen. Wanka et al (138) en Wang en Johnston (140) speculeerden op de mogelijkheid van een geordende 3D gestructureerde staat van het netwerk. Neutron scattering studies toonden aan dat de geobserveerde verandering in viscositeit te wijten is aan een "hard-sphere crystallization" wanneer de micelconcentratie de kritische volume fractie van 0.53 benadert (i.e. 'micelles close-packs') (144). Bij lagere temperaturen zal de gel terug heroplossen (142). Vadhvani et al (145) verklaren dat het endotherme gellingsmechanisme wordt gedreven door de entropie. De entropieverandering van de evenwichtsreactie is tegen de normale verwachting in positief aangezien er een structurering optreedt door aggregatie van hydrofobe segmenten. Maar het feit dat een grote hoeveelheid gebonden water vrijgesteld wordt, wat voor de gelling geabsorbeerd was aan het hydrofobe gedeelte, zorgt voor een enorme toename in het aantal vrijheidsgraden dat de ordening overtreft. Dit resulteert in een spontaan gellingsproces indien de temperatuur toeneemt, zodat de entropieterm ($T\Delta S$) in de eerste wet van thermodynamica de nadelige enthalpie kan overwinnen.

I.5.3. De toxicologische eigenschappen van Pluronics®.

Sinds 1952 worden de toxicologische eigenschappen van Pluronic® F127 onderzocht. Uit deze studies blijkt dat Pluronics® een lage acute toxiciteit bezitten bij orale toediening en een laag risico tot irritatie of overgevoeligheid bij dermaal gebruik (146).

Subchronische en chronische studies van de blokcopolymeren tonen een lage toxiciteit aan welke vermindert indien het moleculair gewicht en het ethyleenoxidegehalte van het polymeer verhoogd wordt (146).

Uit acute toxiciteitstesten op aquatische organismen blijkt dat deze surfactantia ook een lage aquatische toxiciteit vertonen. De LC50/EC50 waarden voor vissen, watervlooien en

algen variëren van 100 ppm tot 2000 ppm en hoger. Zelfs bij de laagste LC50 waarden, kunnen deze producten als niet-toxisch voor het aquatische leven gekatalogeerd worden. De LC-waarde staat voor de letale concentratie. LC-waarden worden doorgaans gebruikt om te refereren naar de concentratie van een chemische component in de lucht of een chemische component in water. De term EC50 - half maximale effectieve concentratie - refereert naar de concentratie van een medicijn, antilichaam of toxische component dewelke een respons induceert halverwege de basislijn en een maximum na een specifieke blootstellingstijd (146).

Intraveneus geïnjecteerde Pluronic® F127 hydrogelen in dieren worden snel uitgescheiden via de urine met enige accumulatie in de longen, lever, hersenen en nieren. Li et al (147) onderzochten de kinetiek na een injectie van Pluronic® F127 in ratten. De data toont aan dat Pluronic® die geïntroduceerd worden in het lichaam snel uitgescheiden worden. De beschikbare data impliceren geen verontrusting over carcinogene gevaren. Gebaseerd op de veiligheidsdata en de informatie dat het productieproces gecontroleerd kan worden voor het limiteren van ongewenste onzuiverheden, concludeerde het Amerikaans college van toxicologie dat Pluronic® F127 veilig is voor medisch en farmaceutisch gebruik (148).

I.5.4. Het gebruik van Pluronic® F127 in medische en farmaceutische toepassingen.

Voor gebruik in medische en farmaceutische toepassingen heeft de U.S. Food and Drug Administration (FDA) een aantal blokcopolymeren goedgekeurd, waaronder Pluronic® F68 en Pluronic® F127 (149). Deze blokcopolymeren worden ook aangeboden voor de farmaceutische industrie onder de productnaam Lutrol® (146). Pluronic® F127 wordt aangewend in verschillende farmaceutische formulaties (150-154). In Tabel I.5.2 is een chronologisch overzicht weergegeven van producten die het copolymeer bevatten. Ze zullen de oplosbaarheid van hydrofobe moleculen bevorderen in polair midden (150, 155). Zo zal de oplosbaarheid van piroxicam en nifedipine in water toenemen na het toevoegen van Pluronic® F127 (156-157).

Tabel I.5.2 - Chronologisch overzicht van farmaceutische toepassingen met Pluronic® F127.

Product	Producent	Jaar
Omeprazole	Dr. Reddy's Laboratories Inc., Beverley, England, UK	1988
Gabapentin	Glenmark Generics Inc., Mahwah, NJ, USA	1993
Neurontin	Pfizer U.S. Pharmaceuticals Group, New York, NY, USA	1993
Famciclovir	Apotex Inc. Toronto, ON, Canada	1994
Isentress	Merck & Company Inc., Whitehouse Station, NJ, USA	2007
Multaq	Sanofi-Aventis, Paris, France	2009

De eerste toepassing van thermo-reversibele systemen gebaseerd op PEO-PPO-PEO werd gerapporteerd in het midden van de jaren tachtig. In deze studies, uitgevoerd door Miyazaki et al (158) en Morikawa et al (159), worden tumordodende producten geïncorporeerd in thermoresponsieve Pluronic® die gebruikt worden als geneesmiddelafgiftesysteem. Hierop volgend hebben meerdere wetenschappers hun onderzoek gewijd aan het zoeken naar nieuwe biomedische toepassingen voor Pluronic® triblokcopolymeren.

Ricci et al (160-161) onderzochten de toepassing van Pluronic® F127 voor een gecontroleerde afgifte van lidocaïne voor de behandeling van chronische pijn, dit om tegemoet te komen aan de korte duur van de farmacologische effecten. Zij toonden aan dat een toename van de copolymeerconcentratie de vrijstellingssnelheid van het geneesmiddel zal verlagen waardoor het pijnstillend effect langer kan aanhouden.

Xuan et al (162) gebruikten Pluronic® F127 voor het intramusculair inbrengen van piroxicam, hetgeen ook een component is met een beperkte verblijftijd die aangewend wordt voor het bestrijden van chronische pijn.

Bansal et al (163) formuleerden een *in situ* gel die twee soorten antibiotica (levofloxacin en metronidazole) bevat voor een gecontroleerde afgifte van deze stoffen voor het behandelen van periodontitis. Zij gebruikten een 20% (g/v) oplossing van Pluronic® F127 in combinatie met chitosan (1.5% (g/v)) waarbij een thermo-responsieve gel wordt bekomen die via injectie kan ingebracht worden met een gecontroleerde afgifte van de actieve componenten.

Pluronic® F127 wordt wijdverspreid gebruikt in dermale toepassingen met pijnstillers of ontstekingsremmers voor het bestrijden van lokale pijn en ontstekingen (151, 164). In deze toepassing is ook de mogelijkheid nagegaan van de copolymeren voor de gecontroleerde afgifte van kanker bestrijdende middelen, antibiotica, diuretica en antiseptica (151, 165-166). Ondanks zijn vele voordelen wordt Pluronic® F127 gekarakteriseerd door korte *in vivo* verblijftijden (167-168).

Naast de toepassingen als drager voor geneesmiddelafgifte heeft Pluronic® F127 klinische en therapeutische toepassingen in de behandeling van verschillende fysiopathologische aandoeningen. Het kan zich direct verplaatsen in de cellen voor het moduleren van verschillende cellulaire routes, mitochondriale ademhaling, apoptotische signaaltransductie, de activiteit van efflux transporters en genexpressie (169).

Pluronic® F127 thermo-responsieve hydrogelen kennen talrijke biofarmaceutische toepassingen. In recente jaren is Pluronic® F127 algemeen gebruikt in het onderzoek naar geneesmiddelafgifte voor rectale (152, 170-179), oogheelkundige (180-186), nasale (187-190) of vaginale (191-194) toepassingen.

Het gebruik van Pluronic® als bestanddeel van systemen voor gentherapie werd reeds uitvoerig bestudeerd. Astafieva et al (195) konden aantonen dat het gebruik van Pluronic® blokcopolymeren in polykation complexen aanleiding geeft tot een verhoogde *in vitro* transfectie-efficiëntie.

Tot op heden is er enkel één gelformule die Pluronic® F127 bevat (20% (g/v)) met de naam LeGoo® (ontwikkeld door Pluromed Inc., MA, USA) (196) en goedgekeurd door de FDA voor tijdelijke endovasculaire occlusie van aders. Geen enkel ander systeem van een Pluronic® F127 gebaseerde hydrogel is op heden goedgekeurd voor klinisch gebruik. Dit kan men toeschrijven aan de knelpunten in de biologische uitdagingen en wetgeving.

I.6. Concept

Als uitgangsmateriaal wordt Pluronic® F27 geselecteerd. Dit copolymeer is goedgekeurd door de 'U.S. Food and Drug Administration' (FDA) voor medische en farmaceutische toepassingen. Een belangrijk argument is dat waterige oplossingen van Pluronic® F127 micellaire vloeistoffen zijn bij kamertemperatuur en zullen geleren bij fysiologische temperatuur. Echter volstaan de korte *in vivo* verblijftijden en zwakke mechanische eigenschappen niet voor de meeste klinische toepassingen. Om hieraan tegemoet te komen worden er verschillende Pluronic® F127 macromonomeren gesynthetiseerd en gekarakteriseerd in hoofdstuk II. De eindstandige hydroxylgroepen van de Pluronic® keten worden chemisch gemodificeerd tot een polymeriseerbare eindgroep. Deze derivatisatie laat toe een covalent vernet polymeernetwerk te bekomen. Hierbij kan de fysische gelering gekoppeld worden aan de voordelen van een permanent vernet netwerk. Het ontwerp van verschillende macromonomeren laten diverse polymerisatietechnieken toe die geëvalueerd worden in functie van hun cytotoxiciteit en celviabiliteit.

In hoofdstuk III wordt er onderzocht in welke mate de fysicochemische eigenschappen behouden blijven door de eindgroepmodificatie. Er zal zowel gekeken worden naar het micel-vormingsproces als het geleringsgedrag. De geleringseigenschappen zullen onderzocht worden via DSC, reologie en de 'tube inversion method' en de invloed van een fysiologische zoutconcentratie zal onderzocht worden. De gelvorming bij fysiologische temperatuur dient behouden te blijven om Pluronics® aan te wenden als bioinkt voor het genereren van sacrificiële structuren.

In hoofdstuk IV worden er covalent vernette structuren ontwikkeld uitgaande van verschillende polymerisatiestrategieën. Hierbij zal er een onderscheid gemaakt worden tussen radicalaire-, nucleofiele additie- en condensatiereacties. Hydrogelen die ontworpen zijn voor celencapsulatie dienen in staat te zijn om een gel te vormen zonder dat ze de cellen schade berokkenen. Alsook mogen ze na gelering niet toxisch zijn voor de cellen en het omringende weefsel en dienen ze diffusie van nutriënten en metabolieten toe te laten. Verschillende mechanismen dicteren hoe cellen en moleculen mogelijks geïncorporeerd kunnen worden in een draagstructuur. De derivaten dienen een milde vernetting toe te laten onder fysiologische omstandigheden. Een belangrijk element in dit hoofdstuk is het al dan niet gebruik maken van een radicaalinitiator. Alsook zal er nagegaan worden of de bekomen hydrogelen aangewend kunnen worden voor de gecontroleerde afgifte van macromoleculen.

De hydrogelmaterialen dienen in het lichaam simultane cellulaire functies te vervullen (celadhesie, proliferatie en differentiatie) en dienen in staat te zijn om weefsel te ontwikkelen. Daarom worden er in hoofdstuk V extracellulaire matrix mimetische structuren ontwikkeld voor een gecombineerd gebruik met Pluronic® hydrogelen. Er wordt een methacrylaat derivaat van het zwitterionisch fosforylcholine gesynthetiseerd (MPC). Fosforylcholine heeft een uitstekende weerstand voor aspecifieke proteïne adsorptie en celadhesie. MPC zal via een dipcoatingsstap met dopaminemethacrylamide afgezet worden op een oppervlak en gecopolymeriseerd worden met de Pluronic® derivaten. De bekomen materiaaloppervlakken zullen geanalyseerd worden met XPS, ATR-FTIR, ellipsometrie en statische contacthoekmetingen. Alsook zal in het hoofdstuk preliminaire *in vitro* testen uitgevoerd worden, waarbij de cytotoxiciteit onderzocht zal worden en de viabiliteit van de verschillende derivaten.

In hoofdstuk VI worden de parameters op punt gesteld voor het plotten van een hydrogel via de bioplotter technologie. Dit doseringsproces dient in een laagsgewijze manier een perfecte interconnectieve draagstructuur op te bouwen die celmigratie toelaat. Een theoretisch, wiskundig procesmodel voor de strutdiameter, debiet en porositeit zal opgesteld en getoetst worden.

II Synthese en karakterisatie van Pluronic® macromonomeren.

In de volgende paragrafen worden verschillende syntheses van polymeriseerbare Pluronic® F127 derivaten besproken. De resultaten uit dit hoofdstuk zijn gepubliceerd met als titel: "Cross-linkable, thermo-responsive Pluronic® building blocks for biomedical applications: synthesis and physico-chemical evaluation" (197). De inbreng in deze publicatie was de synthese, karakterisatie en de bepaling van zijn fysico-chemische eigenschappen. De ontwikkeling van Pluronic® F17 derivaten was onderdeel van de masterthesis van Mieke Vadenhaute (2009) met als titel "Vernetbare Pluronic® derivaten als nieuwe generatie van stimuli-responsieve polymeermaterialen". Dit onderzoekswerk kaderde in het samenwerkingsproject 'Hydrotex' met Centexbel (Zwijnaarde). Dit project heeft geleid tot het patent WO 2011138030 A3: "Composite materials for fibres, membranes and textile coatings and method for its preparation".

II.1. Inleiding.

De fysische eigenschappen van een oplossing Pluronic® F127 volstaan niet voor de meeste klinische toepassingen door zijn beperkte mechanische stabiliteit (198). Deze worden gekarakteriseerd door korte *in vivo* verblijftijden. Het doel van dit hoofdstuk is om aan deze tekortkoming tegemoet te komen door het ontwikkelen van polymeriseerbare Pluronic® F127 derivaten die vernetting toelaten onder fysiologische omstandigheden. De verschillende derivaten laten toe om diverse vernettingsstrategieën (zie § IV) te evalueren en te toetsen in functie van de celviabiliteit.

Pluronic® bezitten een hydroxylfunctie aan hun α - en ω - terminus. Deze eindgroepen kan men omzetten naar een reactieve functionele groep. Eén van de meest frequent toegepaste modificatiestrategieën van PEO-eindgroepen omvat hun esterificatie met behulp van een zuurchloride of anhydride (199-203). Via ringopeningspolymerisatie werd

door Hubbell (204) en Casey (205) de poly(ethyleen oxide) keten verlengd met een aantal structurele eenheden glycolzuur of melkzuur in de A-B-A blokcopolymeerstructuur. In een daaropvolgende reactiestap worden de alcoholeindgroepen omgezet naar acrylaatesters. Park et al (206-207) transformeerden de alcoholfuncties van Pluronic® F127 tot acrylaatesters. Hubbell (208-209) zette reeds de eerste stappen tot een dithiol- en diacrylaatderivaat. Een manier om de degradatie te sturen is door middel van incorporatie van een oligoglycolzuur, -melkzuur of ϵ -caprolacton entiteit tussen de Pluronic® F127 eindgroep en de vernetbare groep (210-211). Een electro-actief copolymeer werd gesynthetiseerd door het koppelen van tetra aniline met Pluronic® F127 (212). Een eindfunctionalisatie met liponzuur werd uitgevoerd door Song et al (213).

De ontwikkeling van de verschillende derivaten in dit doctoraat kan het best begrepen worden uit het streven naar milde polymerisatieomstandigheden in combinatie met cellen. Pluronic® F127 bismethacrylaat wordt geselecteerd als referentiemateriaal omdat er uit een voorgaand project (Hydrotext) de kennis bestaat om deze op een reproduceerbare manier te synthetiseren en op te schalen. Een derivaat met een hogere reactiviteit wordt bekomen met Pluronic® F127 bisacrylaat (214). Hierdoor kan de hydrogel sneller worden vernet tijdens een 3D plotproces. Een acrylaat zal een snellere polymerisatiekinetiek vertonen ten opzichte van een methacrylaatderivaat onder dezelfde condities (215). Er wordt geanticipeerd dat radicalen die ontstaan tijdens een UV foto initiatorproces de cellen schade kunnen berokken bij encapsulatie. Gezien de finale toepassing het simultaan plotten is van een hydrogel in combinatie met cellen, wordt er geopteerd om initiatorvrije systemen te ontwikkelen dewelke milde polymerisatiecondities toelaten. Hierbij kan Pluronic® F127 bisacrylaat in combinatie met een commercieel thiol vernet worden door middel van een Michaël type reactie.

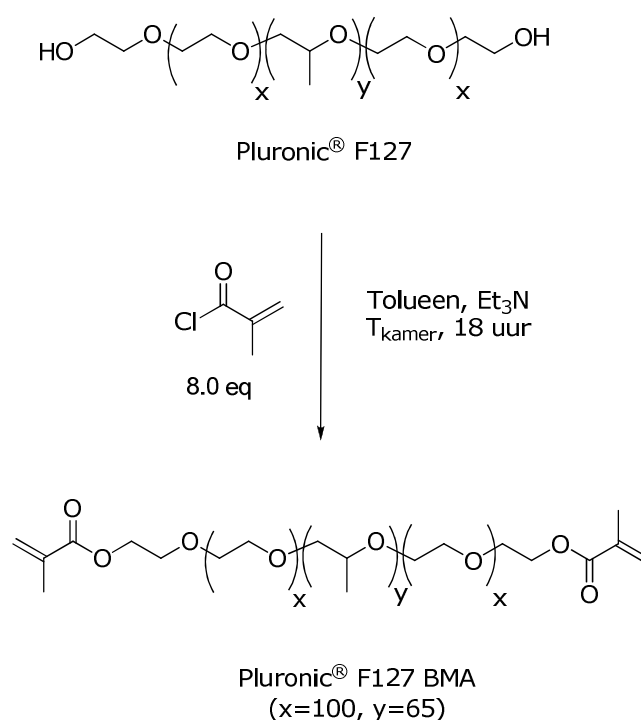
Er is geopteerd om Pluronic® F27 bisacrylamide te synthetiseren (via het bisamine) omdat door mildere vernettingscondities een hogere biocompatibiliteit wordt verwacht. Bovendien kan deze de hydrolytische stabiliteit sturen van de finale netwerken (216). Een alternatief dat kan aangewend worden in de Michaël type reacties is Pluronic® F127 bisthioacetaat. De keuze voor dit derivaat berust op de mogelijkheid dat onder basische,

fysiologische omstandigheden het thioacetaat *in situ* omgezet kan worden naar het overeenkomstige thiol (209, 217). Deze kan vervolgens een nucleofiele additiereactie ondergaan met een (meth)acrylaat en vernet worden. De bescherming van de thiol functie zal ongecontroleerde polymerisatie tegengaan.

Een laatste initiatorvrij systeem wordt bekomen met Pluronic® F127 di-IPTS, dewelke kan polymeriseren door een condensatiereactie (na hydrolyse van de ethoxygroepen) bij fysiologische temperatuur. In hoofdstuk IV en V zal er nagegaan worden of de reactiecondities celencapsulatie mogelijk maken.

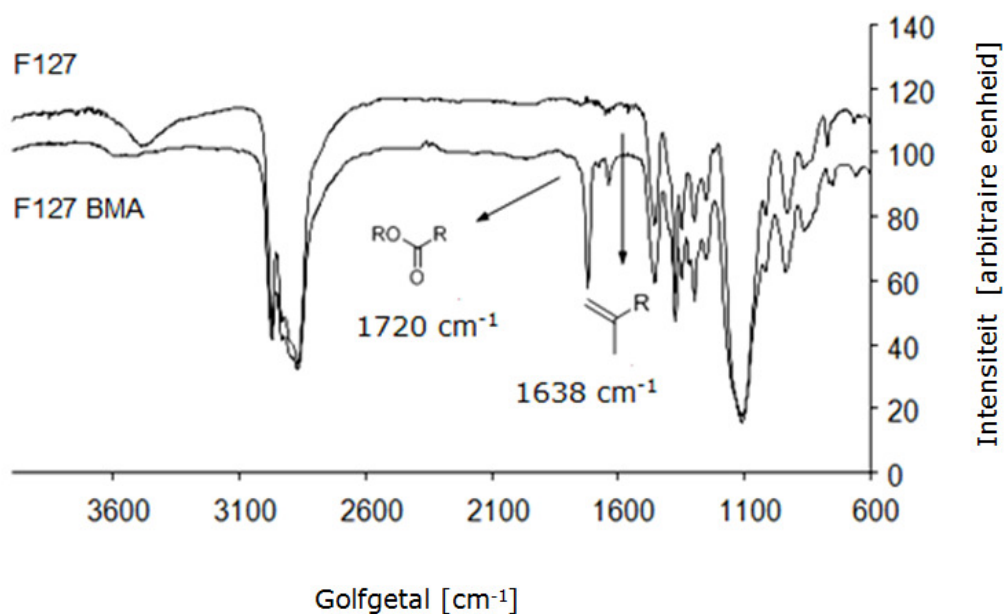
II.2. Synthese en karakterisatie van Pluronic® F127 bismethacrylaat.

In deze synthese worden de eindstandige hydroxylfuncties van Pluronic® F127 omgezet tot vernetbare methacrylaatgroepen met behulp van methacryloylchloride in aanwezigheid van triethylamine als base die instaat voor het neutraliseren van het vrijgekomen waterstofchloride (Figuur II.2.1). De reactie gaat door overnacht bij kamertemperatuur in hoog rendement (> 95%) met toluene als solvent.



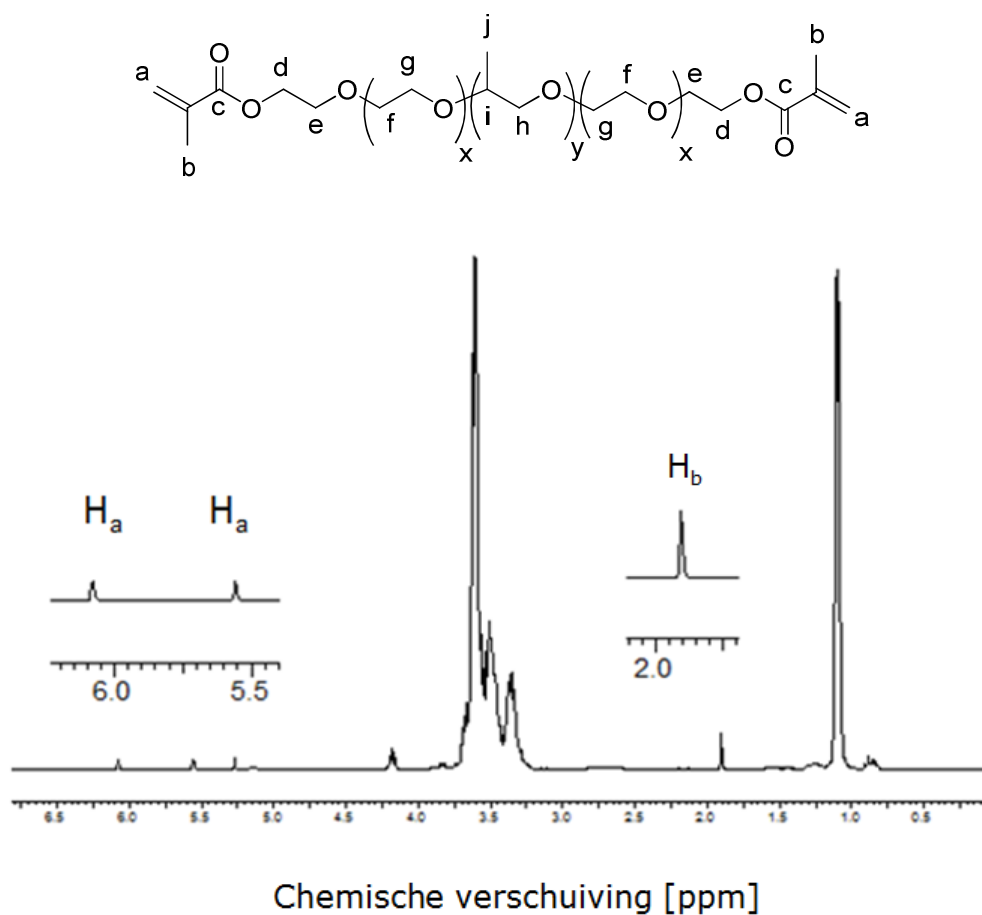
Figuur II.2.1 - Synthese van Pluronic® F127 bismethacrylaat.

In Figuur II.2.2 is het FTIR spectrum van Pluronic® F127 en Pluronic® F127 BMA weergegeven. De piek gelegen rond het golfgetal 3480-3300 cm^{-1} wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van hydroxylfuncties. Deze piek is sterk uitgesproken bij het uitgangspunt maar mindert in intensiteit bij het gemodificeerde. Dit wijst op een verminderd aantal hydroxylfuncties na reactie. De restpiek is het resultaat van een kleine fractie aan niet gemodificeerde hydroxylgroepen. Rond het golfgetal 1720 cm^{-1} kan in het spectrum van het BMA derivaat een additionele absorptieband worden waargenomen. Deze piek is toe te schrijven aan de esterfunctie, welke het resultaat is van het derivatiseren met eindstandige methacrylaatgroepen. De piek op 1638 cm^{-1} kan men toeschrijven aan het alkeengedeelte ($\text{C}=\text{C}$). Beide indicaties geven op kwalitatieve manier aan dat de gewenste reactie, waarbij de hydroxylgroepen omgezet worden tot methacrylaatgroepen, heeft plaatsgevonden. De exacte substitutiegraad dient bepaald te worden.



Figuur II.2.2 - FTIR spectra van Pluronic® F127 en Pluronic® F127 bismethacrylaat.

In Figuur II.2.3 is het ^1H -NMR spectrum van Pluronic® F127 BMA weergegeven. In Tabel II.2.1 is er een eenduidige toewijzing van de protonen in het spectrum opgenomen.



Figuur II.2.3 - Structuurformule en ^1H -NMR spectrum van Pluronic® F127 bismethacrylaat.

Tabel II.2.1 - Toekenning van de protonen van Pluronic® F127 BMA met behulp van ^1H -NMR spectroscopie.

δ [ppm]	Multipliciteit	Integratie	Toekenning
7.28	1	-	CDCl_3
6.13	1	2 H	H_a
5.57	1	2 H	H_a
4.31	3	8 H	$\text{H}_{d,e}$
3.89-3.37	m	1145 H	$\text{H}_{f,g,h,i}$
1.95	1	6 H	H_b
1.15	3	195 H	H_j

Op basis van de integratie van de vinylprotonen kan men op een kwantitatieve manier het functionaliserendement bepalen. De substitutiegraad (i.e. het functionaliserendement) kan bekomen worden na vergelijking van de integraties van de karakteristieke pieken die overeenstemmen met de protonen van de eindstandige methacrylaatgroepen en de integratie van de piek die overeenstemt met de chemisch inerte protonen die niet betrokken zijn bij de modificatiereactie, zoals de protonen van de methylgroep van de PPO-eenheden. De substitutiegraad van de reactie kan berekend worden aan de hand van formule II.1 (207, 218).

$$Substitutiegraad = \frac{3n.I_{CH_2 vinyl}}{4.I_{PPO methyl}} \cdot 100 \quad [II.1]$$

Met n : het aantal PPO-fragmenten in de keten

$I_{CH_2, vinyl}$: de integratie van de eindstandige vinylprotonen

I_{PPO} : de integratie van de methylprotonen van het PPO-blok

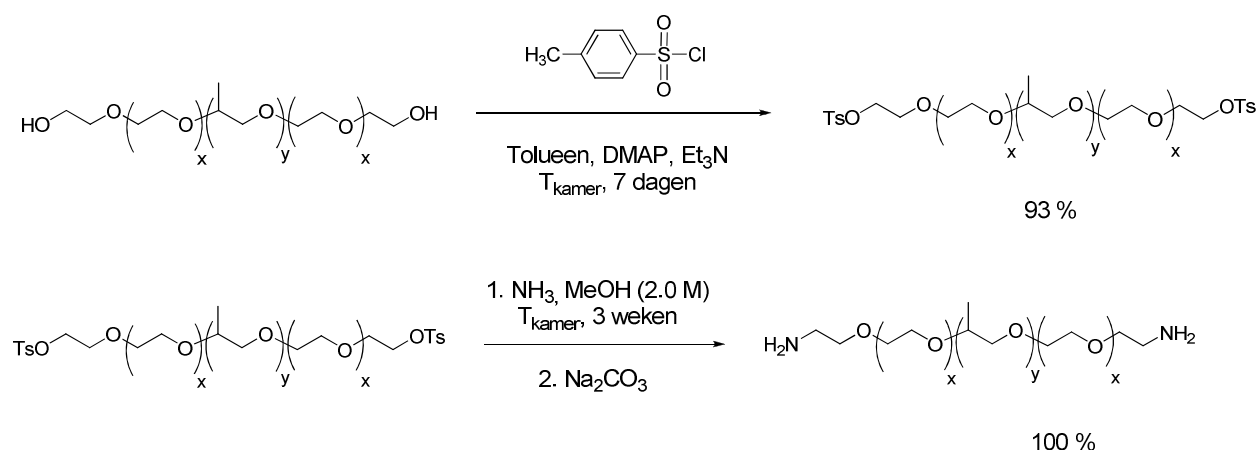
Op basis van de gemeten waarden bekomt men een functionaliserendement van 97.5%. De synthese van Pluronic® F127 BMA is reproduceerbaar en werd succesvol opgeschaald tot meerdere kilogrammen.

Pluronic® F127 bisacrylaat (BA) kan bekomen worden via een identieke syntheseseweg in een rendement van 96%. Hierbij wordt acryloylchloride aangewend als zuurchloride. Pluronic® F127 BA wordt gekarakteriseerd via analoge spectroscopische technieken. Het bekomen functionaliserendement is 90%, gebaseerd op de relatieve piekverhoudingen van de acrylprotonen aan elk ketenuiteinde van Pluronic® ($=CH_2$, 6~6.5 ppm) en de drie protonen van de methylgroep van de propyleenoxide-eenheid ($-CH_3$, 1~1.2 ppm) in de Pluronic® keten. 4-*tert*-butylcatechol (TBC) is een derivaat van catechol dat wordt toegevoegd als een stabilisator en inhibitor voor ongecontroleerde polymerisatie (219).

In een radicalaire polymerisatie zal een acrylaat secundaire radicalen vormen als propagerende eindgroep, terwijl een methacrylaat tertiaire radicalen vormt (hetgeen meer stabiel is dan een secundair radicaal). De stabiliteit van een tertiair radicaal zal de reactiviteit van het propagerende einde verlagen voor verdere polymerisatie (220).

II.3. Synthese en karakterisatie van Pluronic® F127 bisamine.

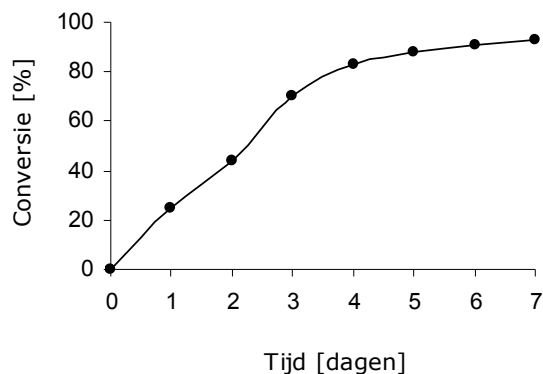
Bij deze reactie worden de eindstandige hydroxylfuncties van Pluronic® F127 omgezet naar een tosylaatgroep (cfr. een goede 'leaving' groep) met *p*-tolueensulfonylchloride. Deze reactie gaat door bij kamertemperatuur in de aanwezigheid van triethylamine als base en DMAP als nucleofiele katalysator met toluen als solvent. In een tweede stap worden de tosylaatgroepen omgezet in een primair amine in aanwezigheid van ammoniak en methanol als solvent (Figuur II.3.1).



Figuur II.3.1 - Syntheseroute van Pluronic Pluronic® F127 bisamine.

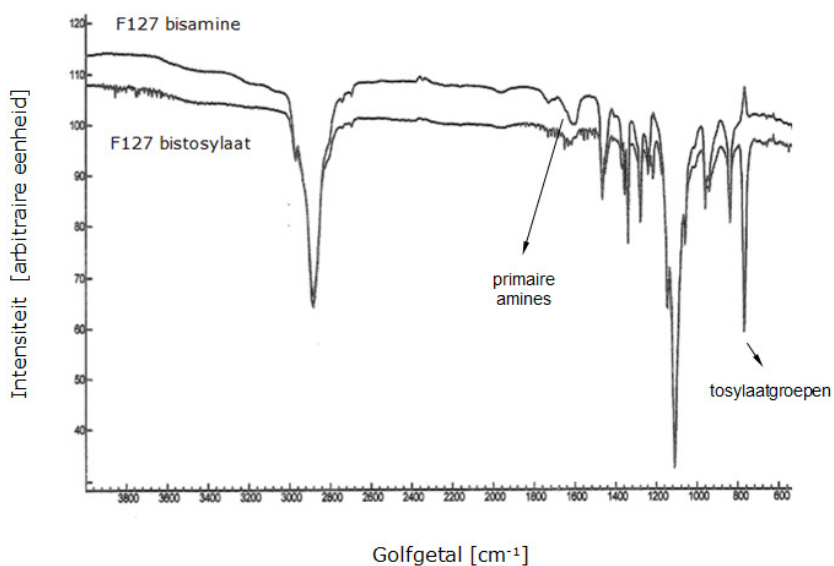
In Figuur II.3.2 is de conversie weergegeven van de tosyleringsreactie bij kamertemperatuur in functie van de tijd, bepaalt via ¹H-NMR. Na zeven dagen bedraagt de conversie 93%. Gezien de lange reactietijden in de eerste stap wordt de conversie in de amineringsstap pas gemeten na één week (46%), twee weken (74%) en na 3 weken (100%). Er wordt voldoende materiaal bekomen voor verdere experimenten in een eerste synthese. Optimalisatie van beide reactiestappen kan bekomen worden door een

verhoging van de temperatuur volgens de vergelijking van Arrhenius (221) of door de equivalentie aan reagentia aan te passen.



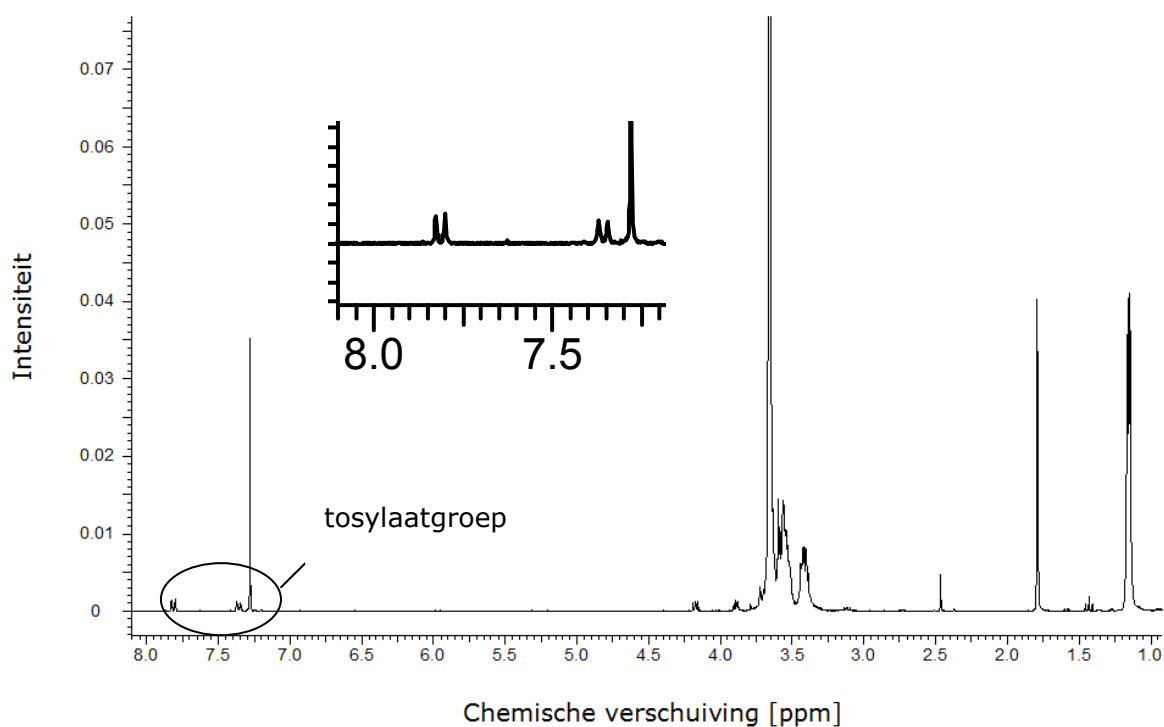
Figuur II.3.2 – Conversie van de tosyleringsreactie van Pluronic® F127 in functie van de tijd (n=1).

Aanwijzingen voor een efficiënte omzetting van het tosylaat naar het overeenstemmende primair amine kunnen teruggevonden worden in het FTIR spectrum (Figuur II.3.3). In het Pluronic® F127 bistosylaat spectrum kan de piek bij 773 cm^{-1} toegeschreven worden aan de tosylaatgroepen. Na de tweede reactiestap is deze piek verdwenen en ontstaat er een piek bij 1609 cm^{-1} , welke kan toegeschreven worden aan primaire amines.

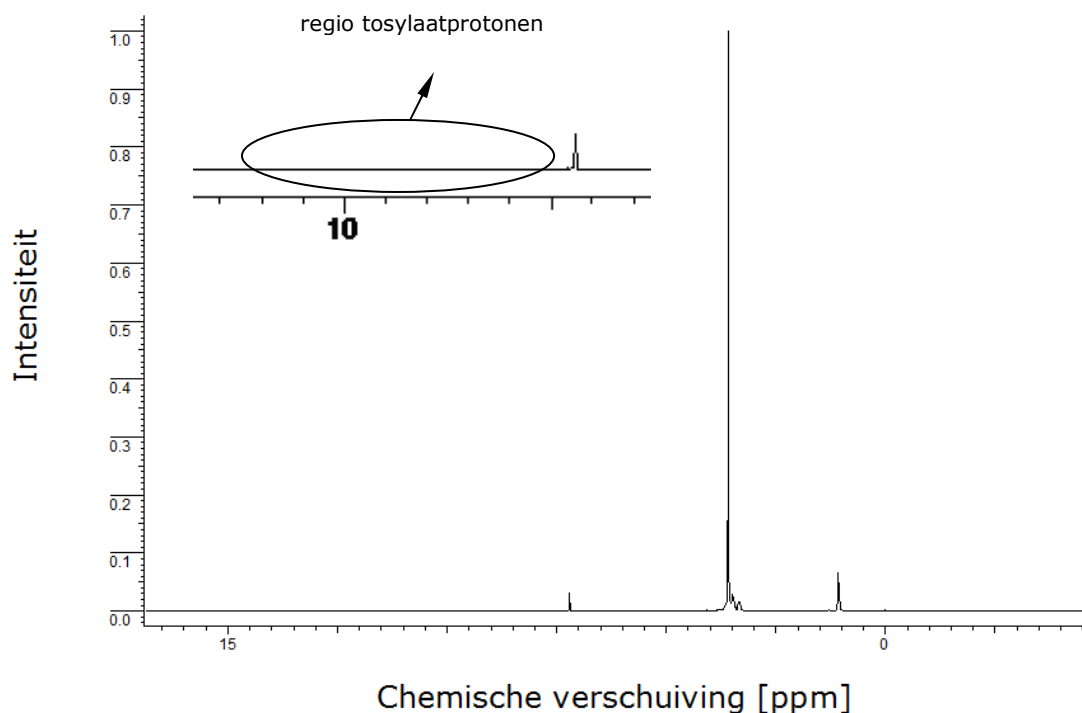


Figuur II.3.3 - FTIR spectrum van Pluronic® F127 bistosylaat en bisamine.

Aan de hand van het ^1H -NMR spectrum kan op eenvoudige manier het functionalisatierendement berekend worden van de tosyleringsreactie (93%) op basis van de tosylaatprotonen (zie Figuur II.3.4). Na de aminolyse zijn de overeenstemmende protonen van de tosylaatgroep volledig verdwenen (zie Figuur II.3.5), het globale opbrengstrendement bedraagt 92% .



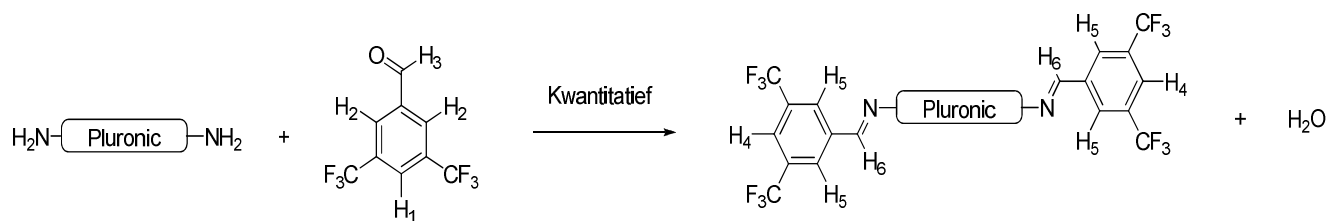
Figuur II.3.4 - ^1H -NMR spectrum van Pluronic® F127 bistosylaat.



Figuur II.3.5 - ^1H -NMR spectrum van Pluronic® F127 bisamine.

Het aantal primaire aminefuncties ingevoerd op Pluronic® F127 kan bepaald worden via ^{19}F -NMR spectroscopie (222). Het macromonomeer wordt gederivatiseerd met een trifluorogemethyleerd aromatisch aldehyde (3,5-Bis(trifluoromethyl)benzaldehyde) (Figuur II.3.6). Het resultaat is een Schiffse base (i.e. imine), hetgeen vervolgens gekwantificeerd wordt door de integratie van zijn ^{19}F resonantie te vergelijken met die van 2-chloor-4-fluortolueen als toegevoegde interne standaard (222).

In vergelijking met de grote hoofdketen, zal de lage concentratie aan aminefuncties aanleiding geven tot zwakke (of zelfs niet waarneembare) signalen in het ^1H -NMR spectrum. Aangezien de NMR gevoeligheid voor de ^{19}F kern hoog is, biedt de derivatisatie van de aminefuncties met een fluorderivaat een goede oplossing.

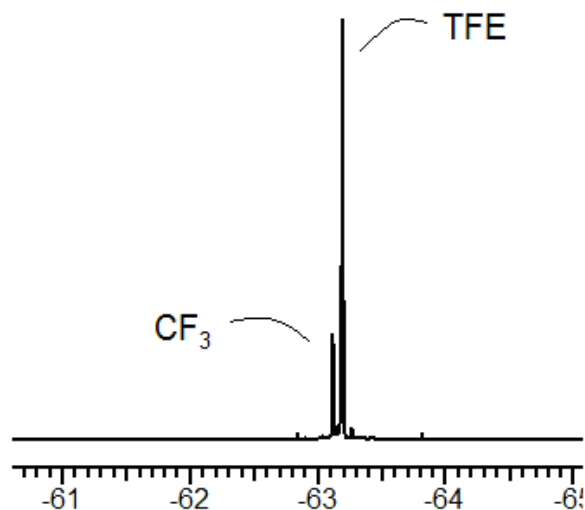


Figuur II.3.6 - Derivatisatie van de primaire amines met een fluorcomponent voor de kwantificatie van de primaire aminefuncties.

Met behulp van onderstaande formule kan het functionaliserendement (f_n) bepaald worden.

$$f_n = \frac{n_{BTF} \times \left(\frac{I_{^{19}\text{F}} \text{ resonantie van het imine}}{2 \cdot I_{^{19}\text{F}} \text{ resonantie van het BTF}} \right)}{\left(\frac{m_{\text{polymeer}}}{M_n \text{ polymeer}} \right)} \quad [\text{II.2}]$$

$$= 98.5\%$$



Figuur II.3.7 - ^{19}F -NMR spectrum van het fluor gefunctionaliseerd Pluronic® F127 bisamine.

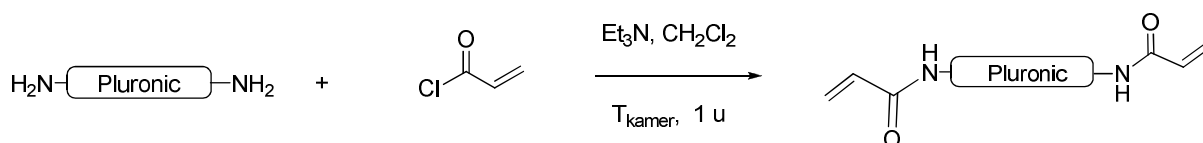
Op basis van een regulier ^1H -NMR spectrum kan men tevens een functionalisatie - rendement bekomen zonder interne standaard (zie Tabel II.3.1) De gemiddelde integratie van een proton na reactie bedraagt 0.0003 eenheden. Op basis van de integratie van de methylprotonen van de Pluronic[®] keten, bekomt men een functionalisatierendement van 99,8%.

Tabel II.3.1 – Toekenning van de protonen van Pluronic[®] F127 bisamine met behulp van ^1H -NMR spectroscopie.

δ [ppm]	Integratie	Toekenning
(Zie Figuur II.3.1)		
8.17	0.1156	H ₁
8.38	0.2469	H ₂ (2H)
10.18	0.1268	H ₃
-	-	H ₄
-	-	H ₅ (2H)
10.47	0.0006	H ₆

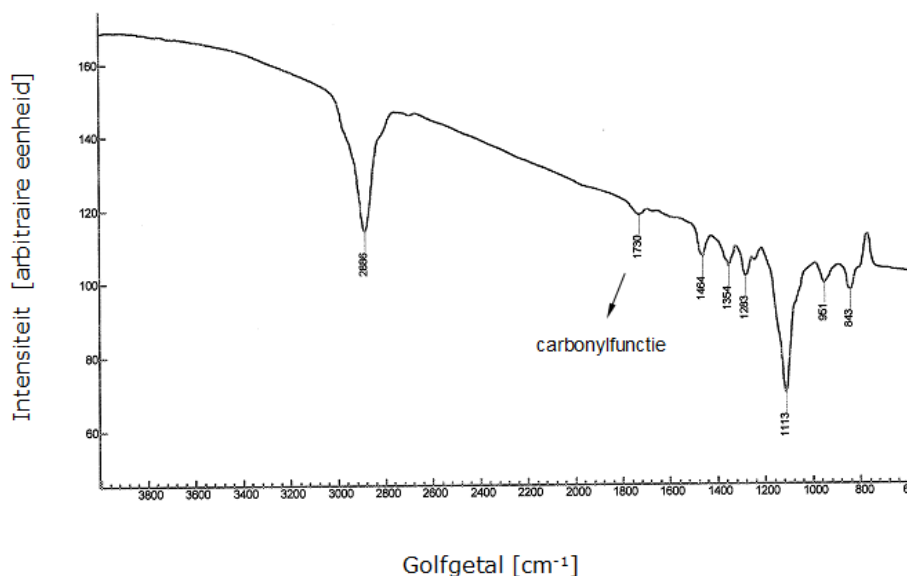
II.4. Synthese en karakterisatie van Pluronic[®] F127 bisacrylamide.

Met behulp van acryloylchloride kan het Pluronic[®] bisamine derivaat na 1 uur volledig omgezet worden naar Pluronic[®] F127 bisacrylamide bij kamertemperatuur met triethylamine als base en dichloormethaan als solvent (zie Figuur II.4.1).



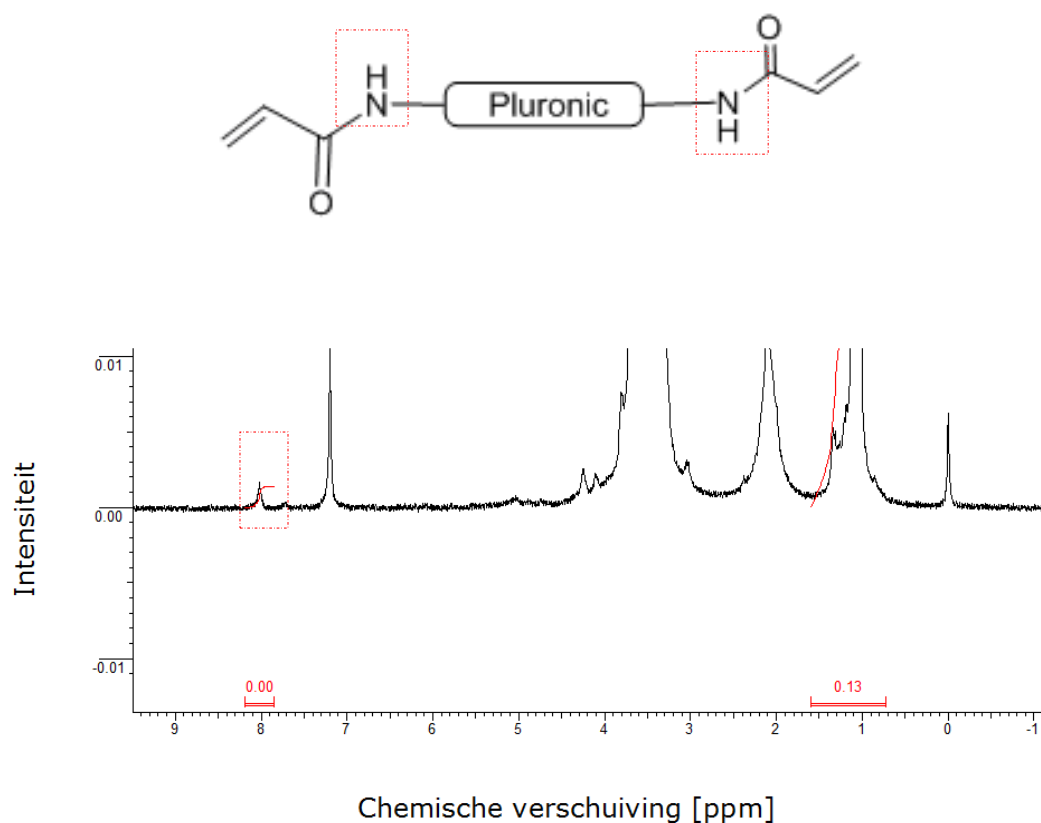
Figuur II.4.1 - Synthese van Pluronic[®] F127 bisacrylamide.

In het FTIR spectrum verdwijnt de absorptieband van het primaire amine (1609 cm^{-1} , Figuur II.4.2) en een piek bij 1730 cm^{-1} kan waargenomen worden, hetgeen men kan toeschrijven aan de carbonylfunctie (Figuur II.4.2). Een FTIR spectrum van Pluronic® F127 bisamine kan terug gevonden worden in Figuur II.4.2.



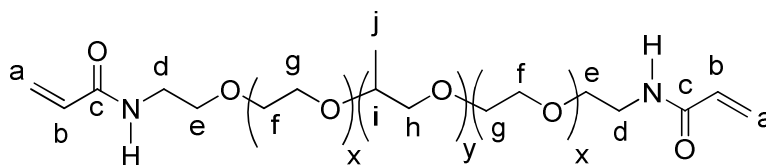
Figuur II.4.2 - FTIR spectrum van Pluronic® F127 bisacrylamide.

In het ^1H -NMR spectrum (Figuur II.4.3) en de analyse (zie Tabel II.4.1) kan er een singlet bij 8.0 ppm worden waargenomen dat kan toegeschreven worden aan het secundair amide. De resonanties van andere protonen van de acrylamidefunctie overlappen met de signalen van de Pluronic® keten. Uit het ^1H -NMR spectrum bekomt men een functionaliserendement van 95.8% en een opbrengstrendement van 88%.



Figuur II.4.3 - ^1H -NMR spectrum van Pluronic® F127 bisacrylamide.

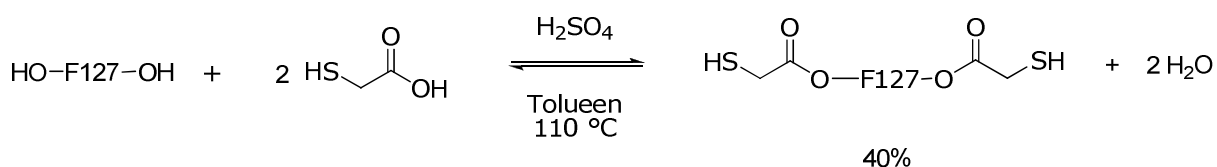
Tabel II.4.1 – Toekenning van de protonen van Pluronic® F127 bisacrylamide met behulp van ^1H -NMR spectroscopie.



δ [ppm]	Multipliciteit	Integratie	Toekenning
8.00	1	0.8 H	H_{NH}
7.28	1	-	CDCl_3
4.31	3	8 H	$\text{H}_{\text{d,e}}$
3.89-3.37	m	1160 H	$\text{H}_{\text{f,g,h,i,a,b}}$
1.15	3	195 H	H_{j}

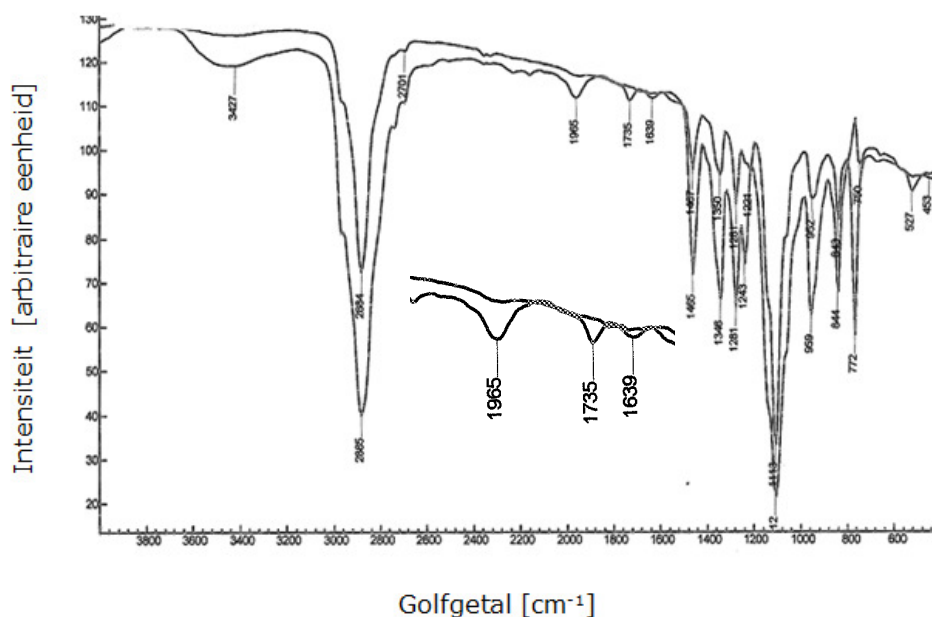
II.5. Synthese en karakterisatie van Pluronic® F127 bisthiol.

In aanwezigheid van een thiolderivaat kan men via een Michaël-type additie een hydrogel bekomen door combinatie met een acrylaat gebaseerde vernetter. Een eerste derivatisering werd uitgevoerd door een directe thiolering met mercaptaanzuur. In Figuur II.5.1 worden de eindstandige hydroxylfuncties van Pluronic® F127 gethioleerd met mercaptaanzuur in aanwezigheid van zwavelzuur als katalysator en tolueen als solvent. Om het evenwicht naar rechts te verschuiven wordt de gevormde water-tolueen azeotroop gedestilleerd.



Figuur II.5.1 - Reactieschema voor een directe thiolering van Pluronic® F127.

Uit kinetische studies (223) is gebleken dat de zelfcondensatie van mercaptaanzuur als mogelijke nevenreactie in bovenstaande reactieomstandigheden niet beduidend voorkomt. Uit NMR analyse blijkt dat de katalytische hoeveelheid zwavelzuur de Pluronic® keten niet splitst. Aanwijzingen voor reactie kan men terugvinden in het FTIR-spectrum bij 1639 en 1735 cm^{-1} (C=O), te wijten aan de gegenereerde esterfunctie. Alsook kan de boventoon van de carbonylvibratie bij 3427 cm^{-1} waargenomen worden (Figuur II.5.2).



Figuur II.5.2 - FTIR spectrum van Pluronic® F127 bithiol.

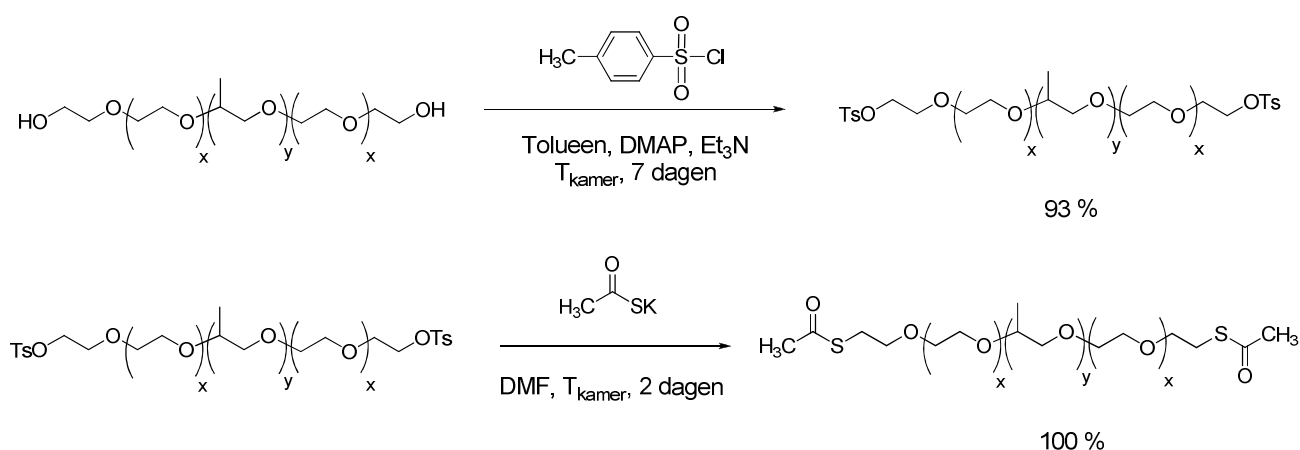
In het ^1H -NMR spectrum kan men uit de integratie van de methylgroepen van de PPO eenheden en de integratie van de methyleenprotonen van de mercaptaanester het functionaliserendement bepalen. Het signaal bij 1.96 ppm toont aan dat de thiol groep niet omgezet is naar een disulfide gelinkt dimeer. De lage rendementen en de lange reactietijden (cfr. kans op hydrolyse van de keten) maakt deze reactieweg ongeschikt. Tevens blijft de mogelijkheid bestaan dat een onbeschermd thiol kan dimeriseren. Daarom wordt in een volgende paragraaf geopteerd om een beschermd thiol in te voeren op de Pluronic® keten.

Tabel II.5.1 - Overzicht van de bekomen functionaliserendementen voor de directe thiolering van Pluronic® F127 voor een reactietijd van 12 en 48 uur.

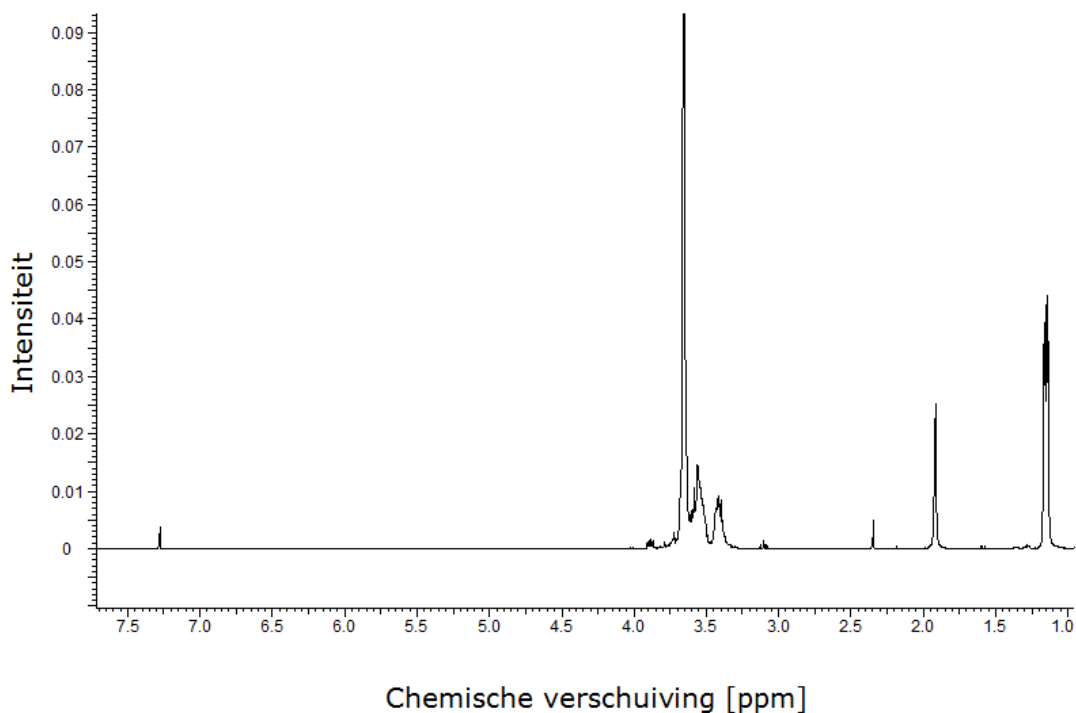
Reactietijd [uur]	Rendement [%]
12	25.3
48	42

II.6. Synthese en karakterisatie van Pluronic® F127 bisthioacetaat.

Pluronic® F127 bisthioacetaat wordt gesynthetiseerd (Figuur II.6.1) door in een eerste stap de alcoholfuncties van Pluronic® F127 om te zetten in het overeenkomstige tosylaat, wat een goede 'leaving group' is (zie § II.3). Het 4-dimethylaminopyridine (DMAP) wordt gebruikt als basische katalysator in combinatie met triethylamine als organische base. Door de aanwezigheid van een tertiaire aminefunctie in de *para*-positie in DMAP ten opzichte van het stikstofatoom in de pyridinering bezit dit stikstofatoom een sterk basisch karakter. In een volgende stap kan het thioactetaat ingebouwd worden (i.e. beschermd thiol) door reactie met kaliumthioacetaat bij kamertemperatuur gedurende 2 dagen in DMF als solvent. Hierdoor voorkomt men een mogelijke vroegtijdige en ongecontroleerde vernettingsreactie ten opzichte van een Pluronic® keten met vrije thiolfuncties. Het thioacetaatderivaat kan onder milde basische omstandigheden hydrolyseren. Aangezien celcultuurmedia zoals Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) licht basisch zijn (pH 7.4), kan het thiol in situ ontschermd worden en vervolgens vernet worden. Het functionaliserendement bedraagt 93% met een opbrengstrendement van 89%.

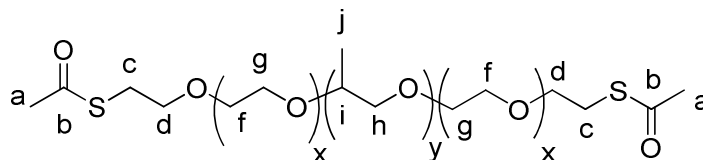


Figuur II.6.1 - Reactieschema voor de synthese van Pluronic® F127 bisthioacetaat.



Figuur II.6.2 - ^1H -NMR spectrum van Pluronic® F127 bithioacetaat.

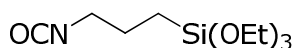
Tabel II.6.1 – Toekenning van de protonen van Pluronic® F127 bithioacetaat met behulp van ^1H -NMR spectroscopie.



δ [ppm]	Multipliciteit	Integratie	Toekenning
7.28	1	-	CDCl_3
3.85	3	4 H	H_d
3.11	3	4 H	H_c
3.89 - 3.37	m	1145 H	$\text{H}_{f,g,h,i}$
1.89	1	6 H	H_a
1.15	3	195 H	H_j

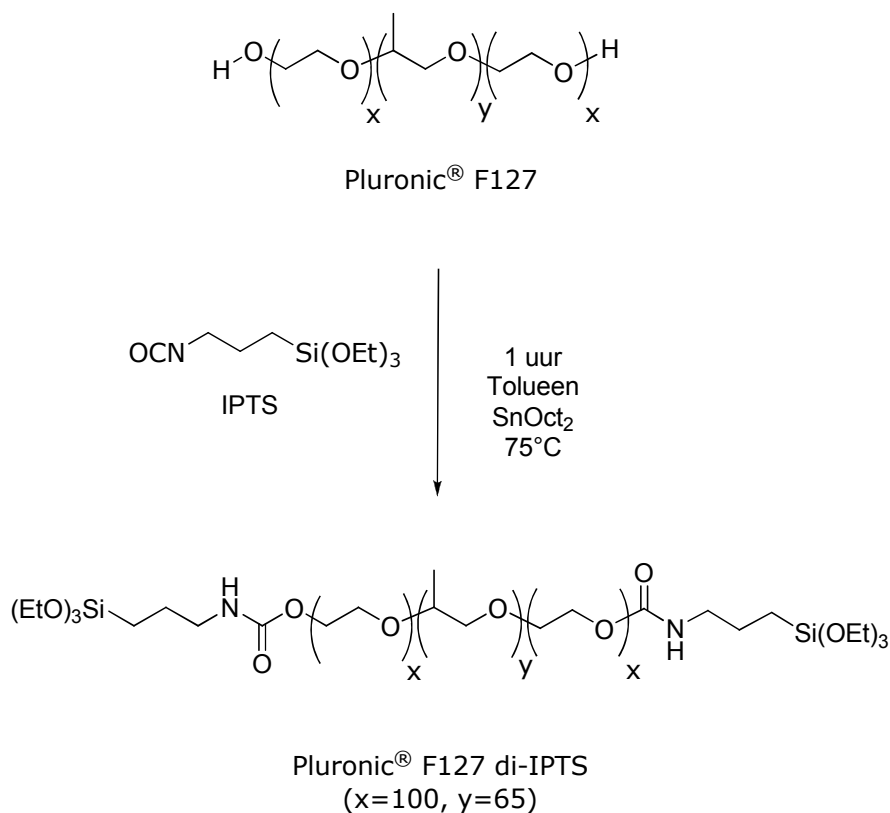
II.7. Synthese en karakterisatie van Pluronic® F127 di-IPTS.

Bij deze modificatie reageert Pluronic® F127 met (3-isocyanatopropyl)triethoxysilaan (IPTS). Deze molecule bevat aan het ene uiteinde een isocyanaat functie en aan het andere uiteinde een triethoxysilaanentiteit (zie Figuur II.7.1).



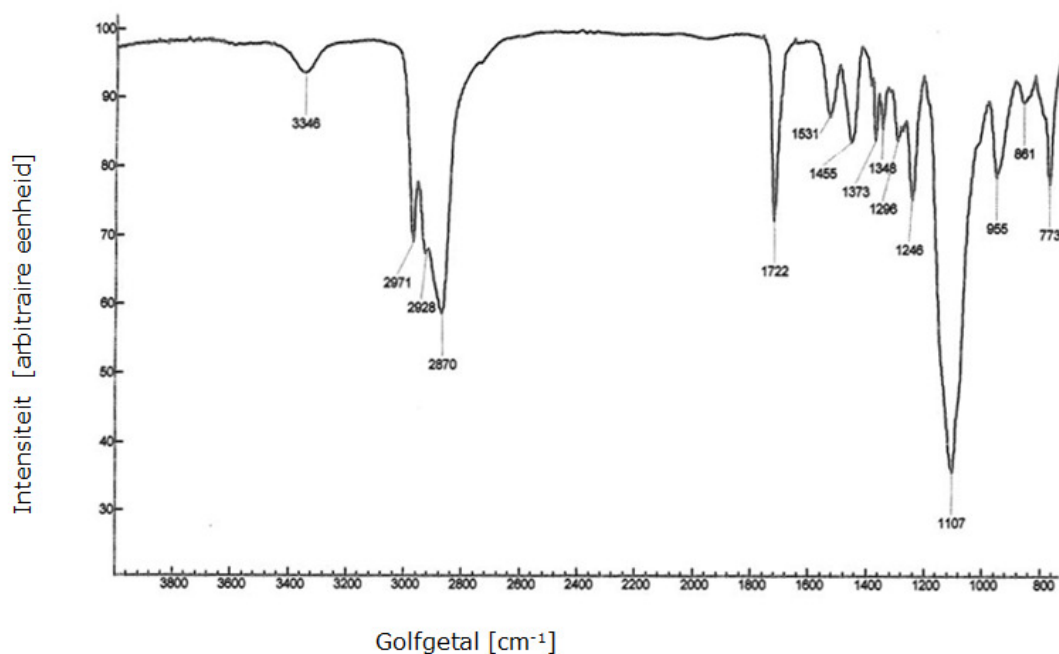
Figuur II.7.1 - Structuur van (3-isocyanatopropyl) triethoxysilaan (IPTS).

De isocyanaatgroep kan reageren met de hydroxylfunctie op Pluronic®, waardoor een urethaanbinding wordt gevormd. In geval van Pluronic® gebeurt deze reactie gedurende 1 uur in aanwezigheid van de katalysator SnOct_2 (Sn(II) 2-ethylhexanoaat) bij 75°C met toluene als solvent. Het resultaat is Pluronic® di-triethylsiloxaan of Pluronic® di-IPTS. De synthese van Pluronic® F127 di-IPTS wordt weergegeven in Figuur II.7.2.



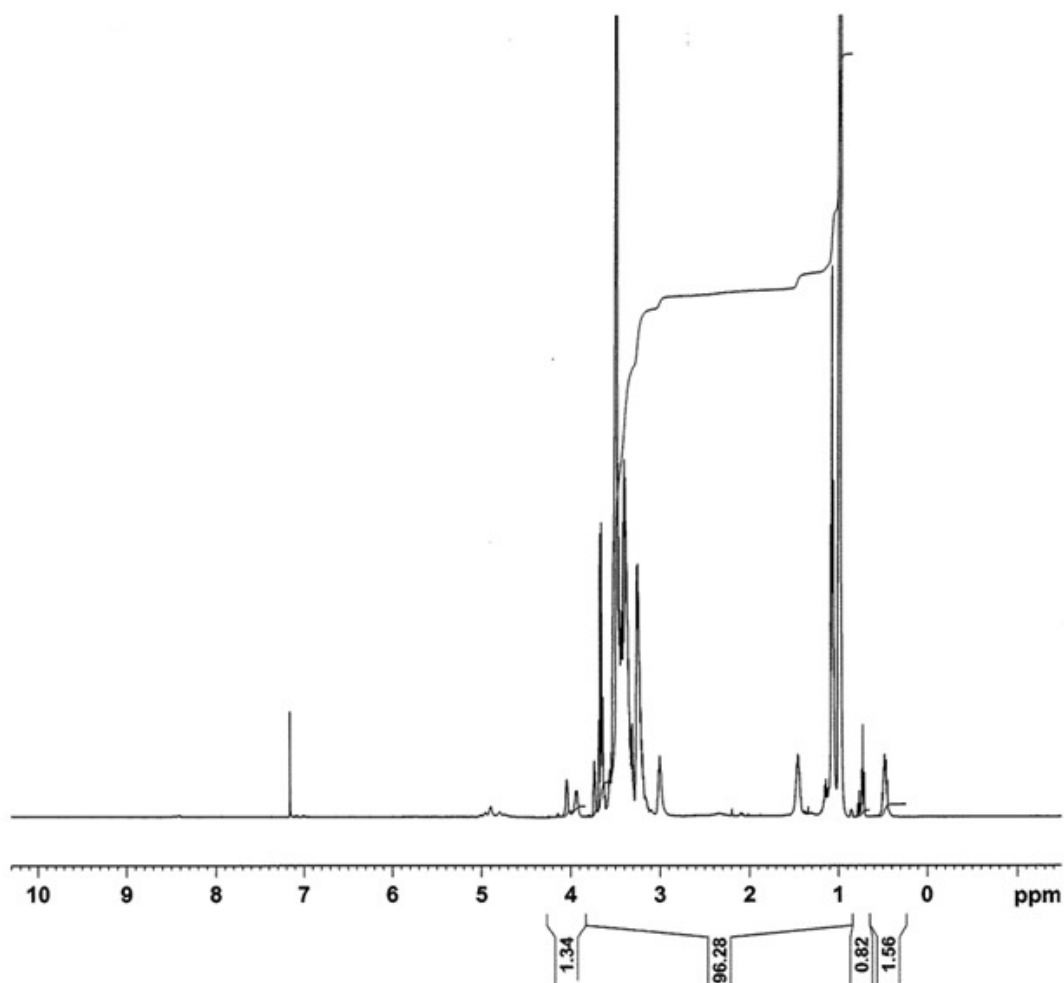
Figuur II.7.2 – Reactieschema voor de synthese van ethoxysilaan getermineerd Pluronic® F127 di-IPTS.

In het FTIR spectrum (Figuur II.7.3) verdwijnt de isocyanaatband bij 2268 cm^{-1} en verschijnt er een piek bij 1720 cm^{-1} , toe te schrijven aan de urethaanbinding.



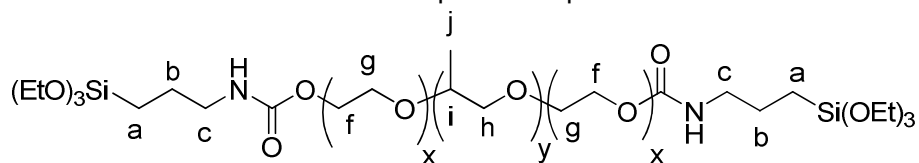
Figuur II.7.3 - FTIR spectrum van Pluronic® F127 di-TESI.

In het ^1H -NMR spectrum (zie Figuur II.7.4) en de analyse (zie Tabel II.7.1) kan men een triplet waarnemen bij 1.19 ppm; toe te schrijven aan de methylprotonen van het IPTS. Ook het quartet bij 3.80 ppm is aanwezig, dit kan men toeschrijven aan de methyleenprotonen van het IPTS. Hieruit kan men een functionaliserendement van 92% afleiden.



Figuur II.7.4 - ^1H -NMR spectrum van Pluronic[®] F127 di-IPTS.

Tabel II.7.1 – Toekenning van de protonen van Pluronic[®] F127 di-IPTS met behulp van ^1H -NMR spectroscopie.



δ [ppm]	Multipliciteit	Integratie	Toekenning
8.40	1	0,7 H	H_{NH}
7.28	1	-	CDCl_3
3.89-3.37	m	1170 H	$\text{H}_{\text{f,g,h,i}} + \text{H}_{\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-}}$
1.19	3	18 H	$\text{H}_{\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-}}$
1.15	3	195 H	H_j

II.8. Conclusies.

De fysische eigenschappen van een Pluronic® F127 hydrogel volstaan niet voor de meeste klinische toepassingen door zijn korte *in vivo* verblijftijden en zwakke mechanische eigenschappen. De eindstandige hydroxylfuncties van Pluronic® F127 laten een functionalisatie naar een polymeriseerbaar derivaat toe. Zes macromonomeren werden gesynthetiseerd in hoog rendement. Meer bepaald werden polymeren gesynthetiseerd met methacrylaat, amine, acrylamide, thiol, thioacetaat en een 3-isocyanatopropyltriethoxysilaan eindgroepen. De derivaten laten verschillende vernettingsstrategieën toe, teneinde milde condities te bekomen voor een gecombineerd gebruik met cellen.

Een methacrylaat en acrylaat derivaat werden gesynthetiseerd uitgaande van het zuur chloride. Een directe thiolering van de hydroxylfuncties met mercaptaanzuur gaat door in lage rendementen, alsook bestaat de mogelijkheid dat vrije thiolfuncties kunnen dimeriseren. Daarom werd er geopteerd om een beschermd thiol in te voeren: een thioacetaat. Dit werd bekomen door het invoeren van een tosylaatgroep, die in een volgende stap werd omgezet in het thioactetaat door reactie met kaliumthioacetaat. Het tosylaatderivaat laat tevens toe om een amine te bekomen door een substitutiereactie met ammoniak. Dit werd omgezet met een zuur chloride naar het acrylamide. Een siloxaanderivaat (IPTS) werd bekomen door reactie van Pluronic® F127 met (3-isocyanatopropyl)triethoxysilaan. Alle derivaten werden gekarakteriseerd door FTIR en NMR analyses.

III Fysico-chemische evaluatie van Pluronic® macromonomeren.

III.1. Inleiding.

Een opmerkelijke eigenschap van de PEO-PPO-PEO blokcopolymeren is de temperatuursafhankelijkheid van zijn fysico-chemische kenmerken (138, 144, 224-225). Waterige oplossingen van het precursormateriaal zullen bij gekoelde temperatuur een vloeibare fase aannemen. Bij blootstelling aan fysiologische omstandigheden zullen deze aanleiding geven tot een faseverandering waardoor de morfologie van de vloeistof verandert in een visceuse massa (sol-gel transitie). Gezien de fysische gelering één van de bepalende factoren is in de keuze van het uitgangspolymeer, is het zeer belangrijk dat deze eigenschap behouden blijft na chemische modificatie. In dit hoofdstuk gaan we na in welke mate een eindgroepmodificatie de fysico-chemische eigenschappen van Pluronic® beïnvloedt. Hierbij wordt zowel gekeken naar het micel-vormingsproces als de fysische gelering als dusdanig en worden de processen thermodynamisch en fysico-chemisch benaderd. Het miceleringsgedrag wordt bestudeerd voor Pluronic® F127 en Pluronic® F127 BMA. Het geleringsgedrag wordt gekarakteriseerd voor alle derivaten, gezien dit de belangrijkste parameter is in de finale toepassing.

III.2. Miceleringseigenschappen van PEO-PPO-PEO blokcopolymeren.

Door het amfifiel karakter van Pluronic® vertonen blokcopolymeren een associatief fasengedrag indien ze opgelost worden in water (1-6). Bij lage temperaturen en concentraties van Pluronic® in water komen de moleculen voor als volledig gesolvateerde unimoleculaire entiteiten, kortweg 'unimeren' genoemd. Indien de concentratie of temperatuur verhoogd wordt, treedt er associatie van de PPO-blokken op met vorming

van multimoleculaire aggregaten onder de vorm van sferische micellen. Deze micellen zijn opgebouwd uit een hydrofobe PPO kern en een hydrofiele en gehydrateerde PEO-corona (137-139, 142, 225-228). Dit fenomeen wordt veroorzaakt door de temperatuur- en concentratieafhankelijke χ -parameter van het PPO blok. Deze parameter, waarvan gebruik gemaakt wordt in de Flory-Huggins theorie, geeft de interactie weer tussen het polymeer en het solvent. Een geobserveerde stijging in functie van de temperatuur en concentratie is een weerspiegeling van het feit dat water verandert van een goed naar een slecht solvent bij toenemende temperatuur (134).

Oplossingen van niet-ionaire oppervlakte actieve agentia in water vertroebelen bij een zekere temperatuur en splitsen uiteindelijk in twee vloeistoffasen. Dit proces is reversibel en de oplossing wordt weer homogeen (helder) wanneer men het mengsel koelt. De temperatuur bij dewelke de oplossing weer helder wordt bij afkoeling is de zogenaamde 'cloud point' temperatuur. Deze temperatuur is karakteristiek voor een bepaalde oppervlakte actieve stof en zal stijgen met een toenemende hoeveelheid ethyleenoxide segmenten in de molecule. Het 'cloud point' is eveneens sterk afhankelijk van de concentratie van het surfactans en zeer gevoelig aan de aanwezigheid van elektrolyten of organische substanties in de waterige oplossing. Het 'cloud point' geeft een indicatie van de temperatuur waarbij een groot aantal functionele eigenschappen van de surfactantia drastisch wijzigen (142).

De 'Lower Critical Solution Temperature' (LCST) staat voor de macroscopische fasenseparatie van het systeem opgelost in water met een turbiditeit tot gevolg. De micelvorming van amfifiele blokcopolymeren is meer complex in vergelijking met de conventionele, laagmoleculaire gewichtssurfactantia. Door de polydispersiteit van de blokcopolymeren is er geen scherpe unimeer-micel overgang, zelfs niet voor polymeren met een kleine polydispersiteitsindex (142).

III.2.1. De thermodynamica van het miceleringsproces van PEO-PPO-PEO blokcopolymeren.

PEO-PPO-PEO blokcopolymeren met een hoge fractie aan PEO-eenheden vormen geen micellen bij kamertemperatuur. Dit kan verklaard worden door het feit dat water een slecht solvent is voor zowel poly(ethyleen oxide) als poly(propyleenoxide) segmenten bij hogere temperatuur (142). Zoals aangegeven door Alexandridis et al (142) zal het miceleringsproces sterk gedreven worden door entropie en vrije energie. De vrije energie door het vormen van micellen is in hoofdzaak een functie van het PPO-blok (i.e. het hydrofobe deel van het copolymeer). Voor de groepen van PEO-PPO-PEO copolymeren met PEO-blokken die een constant moleculair gewicht bezitten en PPO blokken met een variërend moleculair gewicht, zullen de CMC waarden van de Pluronic® oplossingen (bij een gegeven oplossingstemperatuur) afnemen met toenemend aantal PPO segmenten. Dit geeft aan dat polymeren met een groter hydrofoob PPO domein micellen vormen bij lagere concentraties (142). Hogere temperaturen resulteren in lagere CMC-waarden.

Omwille van de structuur van de polymeermicellen is het mogelijk om hydrofobe moleculen 'op te lossen' in water door encapsulatie in de kern van de micellen (229). Er werd vastgesteld dat het oplossend vermogen van dit type micellen groter is voor aromatische moleculen in vergelijking met alifatische verbindingen en invers is met het moleculair gewicht van de opgeloste hydrofobe stof (230). Daarenboven neemt het oplossend vermogen toe met de polymeerconcentratie (231-233), de temperatuur en het relatieve PPO gehalte in de triblokcopolymeren. Een andere interessante eigenschap van Pluronic® micellen is hun stabiliteit. Zelfs indien de concentratie verlaagd wordt onder de CMC, blijven de micellen nog een tijd bestaan.

Micellen zijn dynamische entiteiten waarin een voortdurende uitwisseling van de amfifiele moleculen plaatsvindt tussen de aggregaten en de oplossingsfase. Deze constante associatie-dissociatie processen zijn gebaseerd op een subtiële balans van een som van verschillende interacties tussen (234):

- (1) hydrofobe PPO-blok-water
- (2) hydrofobe PPO-blokken onderling
- (3) hydrofiele PEO-blokken onderling
- (4) solvatering van de PEO-blokken

Hierdoor kan de verandering in Gibbs vrije energie bij micelvorming geschreven worden als:

$$\Delta G_m = \Delta G(HC) + \Delta G(\text{contact}) + \Delta G(\text{packing}) + \Delta G(HG) \quad [\text{III.1}]$$

Waarin:

- $\Delta G(HC)$ is de vrije energie gekoppeld aan de transfer van de hydrofobe PPO-domeinen vanuit het water in de olie-achtige omgeving van de micelkern.
- $\Delta G(\text{contact})$ is de oppervlakte vrije energie toegeschreven aan het contact tussen water en het hydrofobe PPO in de micel.
- $\Delta G(\text{packing})$ is een bijdrage toegewezen aan de insluiting van de hydrofobe copolymeerblokken in de micelkern.
- $\Delta G(HG)$ is de bijdrage toegewezen aan de interacties van de hydrofiele copolymeerblokken van zowel elektrostatische interacties (in het geval van ionaire surfactantia) als voor conformationele effecten.

Voor micellen opgebouwd uit blokcopolymeren is de kinetiek van de associatie-dissociatie sterk verschillend. Aangezien er methoden bestaan om de polymeermicellen te scheiden van hun unimeren die een tijdsbestek inhouden van 1 tot 2 uur, wijst dit erop dat micellen opgebouwd uit blokcopolymeren extreem lang levend zijn (235-238).

Micellering van blokcopolymeren beantwoordt aan het 'closed association' model, welke een evenwicht veronderstelt tussen de molecuair gedispergeerde copolymeren (cfr. unimeren) en multimoleculaire aggregaten (cfr. micellen) (239-240). Er zijn twee hoofdbenaderingen voor de thermodynamische analyses van het micelleringsproces:

- (1) Fasenseparatiemodel; hierbij veronderstelt men dat micellen een gescheiden fase vormen bij de CMC.
- (2) 'Mass-action model'; waarbij aangenomen wordt dat micellen en niet-geassocieerde unimeren zich bevinden in een associatie-dissociatie evenwicht (241).

In beide benaderingen zal de standaard vrije energie veranderen voor de transfer van 1 mol van amfifiliteit van oplossing naar de micellaire fase ΔG (de vrije energie van micellieren). In afwezigheid van elektrostatistische interacties (PEO-PPO-PEO copolymeren zijn niet-ionisch) wordt ΔG° gegeven door (241):

$$\Delta G^\circ = RT \ln(X_{CMC}) \quad [\text{III.2}]$$

Hierbij is R de gasconstante, T de absolute temperatuur en X_{CMC} de kritische micelconcentratie in moleenheden. Om deze eenvoudige uitdrukking te bekomen, dienen we de veronderstelling te maken dat de concentratie aan vrije surfactantia (unimeren) in aanwezigheid van micellen constant is en gelijk aan de CMC-waarde in geval van het fasenseparatiemodel of dat het micelaggregatienummer groot is voor het 'mass-action' model. Na toepassen van de Gibbs-Helmholtz vergelijking, kunnen we de standaard enthalpie van de micellering (139) ΔH° uitdrukken als:

$$\begin{aligned} \Delta H^\circ &= -RT^2 \left[\partial \ln(X_{CMC}) / \partial T \right]_P \\ &= R \left[\partial \ln(X_{CMC}) / \partial (1/T) \right]_P \end{aligned} \quad [\text{III.3}]$$

De standaard entropie van micellieren ΔS° per mol surfactant kan bekomen worden via:

$$\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ - \Delta G^\circ) / T \quad [\text{III.4}]$$

In geval van blokcopolymeermicellering (met een experimentele fout) geldt volgende vergelijking:

$$\partial \ln(X_{CMC}) = \partial(1/T) / \partial(1/T_{CMT}) \quad [\text{III.5}]$$

Waarbij X de molfractie is, T_{CMT} de kritische micelconcentratie is, dus vergelijking [III.3] wordt dan:

$$\Delta H^\circ = R[\partial \ln(X) / \partial(1/T_{CMT})]_P \quad [\text{III.6}]$$

Via DSC kan de micelleringsenthalpie bepaald worden (ΔH°). Metingen van waterige Pluronic[®] oplossingen vertonen endotherme pieken (160, 207). De pieken hebben hoge enthalpiewaarden en zijn breed. Dit kan men toekennen aan het feit dat copolymeren geen zuivere componenten zijn maar bestaan uit een brede moleculaire gewichtsverdeling. Smeltpieken worden breder in aanwezigheid van onzuiverheden. Er dient tevens opgemerkt te worden dat de enthalpieverandering (gemeten via DSC) niet de standaard enthalpieverandering is, maar afhangt van de werkelijke toestand van de copolymeermoleculen vóór en na micellieren. De standaard enthalpieverandering wordt gedefinieerd als de overdracht van 1 mol van het copolymeer van een ideaal verdunde oplossing naar een gesolvateerde micellaire toestand. Copolymeersegmenten interageren enkel met het solvent, daar waar in echte oplossingen de segmenten ook met elkaar zullen interageren. Dit kan zorgen voor discrepanties tussen micelleringsenthalpieën die bekomen zijn via DSC en deze die bekomen zijn met behulp van analyses van Alexandridis et al (242). Er is aangetoond door Hiemenz (243) dat ΔH° waarden, berekend door micelleringsthermodynamica modellen, over het algemeen een slechte overeenkomst vertonen met deze die bepaald zijn via calorimetrie en dit in het bijzonder voor ionische surfactantia.

III.2.2. Vertroebelingsfenomenen van Pluronic® F127 oplossingen in water.

PEO-PPO-PEO blokkopolymere vertonen een omgekeerde temperatuursafhankelijke oplosbaarheid in combinatie met een vertroebelingsfenomeen (lower critical solution temperature). Dit verschijnsel wordt gekarakteriseerd door het 'cloud point'. Het wijzigen van de eindgroep zal de temperatuur waarbij vertroebelingsfenomenen voorkomen wijzigen. In deze paragraaf gaat men na in welke mate het vertroebelingspunt van Pluronic® F127 zal verschuiven.

Verschillende verklaringen voor het vertroebelingsfenomeen zijn gepubliceerd, zoals conventionele dehydratatie van de PEO eenheid, waterstofbinding tussen het zuurstof atoom van de PEO en watermoleculen en polaire-apolaire conformaties van PEO (244). Het 'cloud point' van een niet-ionisch surfactant hangt af van zijn moleculaire structuur, met name het lipofiele (PPO) en de hydrofiele (PEO) deel (245) en kan verhoogd of verlaagd worden in de aanwezigheid van verschillende additieven (245).

Bij de bepaling van het 'cloud point' wordt de surfactantoplossing opgewarmd tot deze volledig troebel is. Vervolgens wordt de troebele oplossing geleidelijk afgekoeld onder constant roeren terwijl de temperatuur gemeten wordt. De temperatuur bij dewelke de turbiditeit verdwijnt en de oplossing weer helder en homogeen wordt, wordt beschouwd als de 'cloud point' temperatuur (212). Volgende methoden voor de 'cloud point' bepaling worden toegepast:

- Methode A: waterige oplossing (1.0 g van het staal + 100 g water)

Deze methode wordt voornamelijk gebruikt wanneer de waterige oplossing van 1 g van het staal en 100 g water troebel wordt tussen 10 en 90 °C.

- Methode B: zoutoplossing van NaCl (50 g/L) (1.0 g van het staal + 100 g NaCl oplossing met concentratie 50 g/L).

Deze methode wordt voornamelijk gebruikt wanneer de waterige oplossing van 1 g van het staal en 100 g water troebel wordt boven 90°C.

- Methode C: zoutoplossing van NaCl (100 g/L) (1.0 g van het staal + 100 g NaCl oplossing met een concentratie van 100 g/L).

Deze methode wordt voornamelijk gebruikt wanneer de waterige oplossing van 1g van het staal en 100 g water troebel wordt boven de 90°C.

Als resultaat (Tabel III.2.1) wordt het wiskundig gemiddelde genomen van de drie resultaten die niet meer dan 0.5°C van elkaar verschillen (ISO norm 1065:1991).

Tabel III.2.1 – 'Cloud point' van Pluronic® F127 en Pluronic® F127 BMA volgens verschillende methoden (n=9).

Methode	Cloud point [°C]	
	Pluronic® F127	Pluronic® F127 BMA
A	[1]	[1]
B	83.1 ± 0.25	64.5 ± 0.25
C	68.3 ± 0.25	48.9 ± 0.25

[1] 'cloud point' van nature uit te hoog om te meten volgens de beschreven methode

Onder methode A ligt het 'cloud point' te hoog waardoor men deze niet kan meten onder de vermelde condities. Door het toevoegen van een anorganisch zout (methode B en C) bekomt men een meetbare waarde. Men kan concluderen dat door de eindgroepmodificatie het 'cloud point' significant ($p < 0.05$) zal dalen, zowel onder methode B als C. Dit ligt in lijn met de verwachtingen en kan men toeschrijven aan de introductie van apolaire eindstandige functies op de Pluronic® keten. Een toenemende hydrofobiciteit zal het 'cloud point' doen dalen, een toenemende hydrofiliciteit zal het 'cloud point' verhogen. Dit ligt eveneens in lijn met de bevindingen van Cardoso da Silva et al (246) voor blokcopolymeren $((\text{PEO})_{10}(\text{PPO})_{16}(\text{PEO})_{10})$ en $(\text{PEO})_1(\text{PPO})_{17}(\text{PEO})_1$, waarbij er gesuggereerd wordt dat architectuur van de ketenfragmenten de solvatatiecapaciteiten van water zal beïnvloeden. Huibers et al (247) stelden een

theoretische calculatiemethode op voor de bepaling van het 'cloud point' van niet ionische surfactantia van apolaire ketens met verschillende structuren.

Een beduidend aspect voor het plotten in celcultuurmedium is de invloed van aanwezige zouten op het fasengedrag van Pluronic® F127 oplossingen. Er zijn verschillende studies betreffende het effect van zouten op het 'cloud point' van niet-ionische surfactantia (248-250). Echter zijn de effecten van hydrotrope, ionische surfactantia (213, 218) en alcoholen of andere polaire moleculen niet duidelijk (251).

Jørgensen et al (252) en Bahadur et al (253) bestudeerden het 'cloud point' van PEO-PPO-PEO triblokcopolymeren in de aanwezigheid van anorganische zouten, waarbij eveneens de temperatuur voor het 'cloud point' daalt. De effecten van zout zijn beschreven in termen van 'salting in' en 'salting out' en volgen de Hofmeister serie (249). De aanwezigheid van verschillende additieven op het fasengedrag van Pluronic® blokcopolymeren werd bestudeerd door Pandya et al (249).

III.2.3. Bepaling van de kritische micleigenschappen van Pluronic® F127 oplossingen.

De kritische triblokcopolymeerconcentratie waarbij onder isotherme omstandigheden, thermodynamisch stabiele micellen gevormd worden, wordt de 'critical micelle concentration' (CMC) genoemd (254). Een analoge definitie bestaat voor de temperatuur. Indien deze een kritische waarde (Critical Micelle Temperature, CMT) overstijgt, worden micellen gevormd.

Lichtverstrooiing en fluorescentie spectroscopie experimenten hebben aangetoond dat PEO-PPO-PEO blokcopolymeren van geschikte PPO/PEO composities en moleculair gewicht effectief polymoleculaire aggregaten in oplossing vormen. De CMC van niet-ionaire oppervlakte actieve stoffen in waterig midden neemt af met toenemende temperatuur (137, 142, 255). De bijdrage van de entropie speelt hierbij een belangrijke rol (256). Het vormen van micellen hangt af van de hydrofoob associërende eigenschappen van de PPO blokken, dewelke op hun beurt afhankelijk is van de temperatuur. Indien de concentratie of temperatuur verhoogd wordt zullen er sferische

micellen gevormd worden. Bij een zekere temperatuur en concentratie zullen de aggregaten aanleiding geven tot een fasenseparatie, dit wordt gekarakteriseerd als het vertroebelingspunt (cloud point) (257-258).

Door gebruik te maken van statische en dynamische lichtverstrooiingsmethoden, stelden Zhou et al (225) het bestaan van drie temperatuurzones vast, waaronder; 'unimer', 'transition' en 'micelle regions'. Bij kamertemperatuur worden deeltjes met een hydrodynamische straal van 2.3 nm en een brede polydispersiteit gedetecteerd. Boven 50°C zullen micellaire moleculaire gewichten lineair toenemen met de temperatuur terwijl de hydrodynamische straal constant blijft bij ongeveer 8 nm (225). Wanka et al (138) bevestigden dat de aggregaatnummers toenemen met de temperatuur terwijl de micelstraal ongeveer constant blijft.

Spectroscopische technieken, gebaseerd op optische absorptie of emissie van licht van een bepaalde 'probe' molecule zijn degelijke methoden voor het onderzoeken van een breed gamma aan fysico-chemische eigenschappen van micellaire oplossingen (259). Fluorescentieprobes worden gebruikt door Turro et al (260) tijdens hun onderzoek naar het gedrag van PEO-PPO blokcopolymeren in water.

Alexandridis et al (142) maakten gebruik van een hydrofobische fluorescentieprobe (i.e. diphenylhexatrieen, DPH) voor de bepaling van het begin van micellering van een aantal Pluronic® blokcopolymeren in waterig midden. De fluorescentie-efficiëntie van DPH is nul in een hydrofiele omgeving. Deze methode vormt dus een gevoelige indicator voor micelvorming met een toenemende oplossingstemperatuur en copolymeerconcentratie. Hierdoor kan de CMC en CMT data bekomen worden, gecorreleerd aan het moleculair gewicht van de Pluronic® en de PPO/PEO verhouding (142).

Alexandridis et al (256) publiceerden de effecten van temperatuur op de micelleringseigenschappen en de structuur van Pluronic® P104 en F108. De CMC en CMT gegevens worden bekomen voor waterige copolymeeroplossingen met een 'dye solubilization' methode (142) en bevestigd met 'differential scanning calorimetry' (DSC), oppervlaktespanning, dichtheid, lichtverstrooiingsintensiteit en fluorescentie

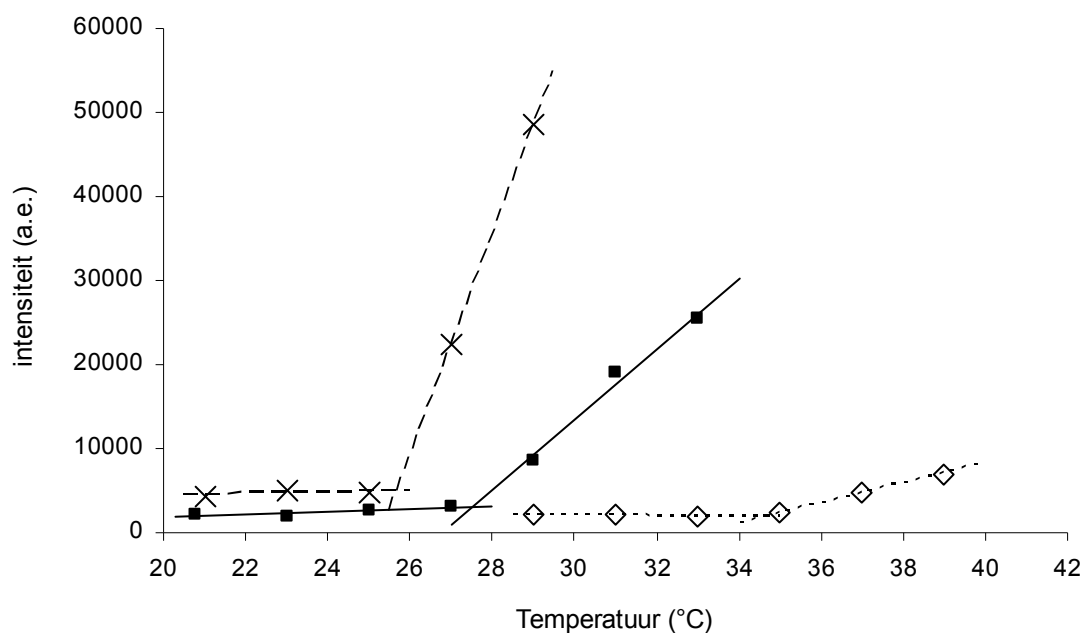
spectroscopie experimenten. De beste overeenkomst tussen de verschillende technieken werd bekomen indien de kritische micellaire concentratie bepaald werd via:

- (i) het begin van de oplosbaarheid van een hydrofobe kleurstof
- (ii) het begin van een endotherme transitie waargenomen in DSC
- (iii) de hoge concentratie breuk in het plot van de oppervlaktespanning in functie van de polymeer concentratie
- (iv) de eerste breuk in het plot van het partiële specifieke volume in functie van de temperatuur (curve)
- (v) het begin van de toename in lichtverstrooiingsintensiteit
- (vi) de onbuigbaarheid in de sigmoïdale curve van de pyreen fluorescentie-emissie intensiteit I_1/I_3 verhouding in functie van de temperatuur

Deze aanwijzingen vereenvoudigen de rapportering van consistente CMC en CMT gegevens voor amfifiele copolymeeroplossingen. De lichtverstrooiingsmetingen zijn een meer gevoelige techniek om de micelvorming in beeld te brengen. De eigenschap van zeer kleine deeltjes om invallend laserlicht in alle richtingen te verstrooien wordt gebruikt om het punt waar de micellen gevormd worden in kaart te brengen. De belangrijkste voorwaarde om lichtverstrooiing te krijgen, is dat de diameter van de lichtverstrooiende deeltjes veel kleiner is dan de golflengte van het invallende licht zelf. De verstrooiing van het invallende licht is symmetrisch in alle richtingen als de diameter van het deeltje niet groter is dan $1/20^{\text{ste}}$ van de golflengte van het invallende licht (261). Bij grotere afmetingen is de verstrooiing asymmetrisch.

Pluronic® F127 oplossingen met een concentratiebereik van 0.1 tot 10 mg/ml worden onderworpen aan een temperatuursinterval van 20 tot 40°C terwijl elke twee graden Celsius een datapunt wordt opgenomen. Hiervoor wordt de intensiteit van het verstrooide licht gemeten, als gemiddelde over een tijdsinterval, onder een hoek van 90° ten opzichte van de invallende lichtbron. Indien de intensiteit van het verstrooide licht uitgezet wordt in functie van de temperatuur (Figuur III.2.1), dan wordt een breekpunt

waargenomen op het moment wanneer de micellen zich beginnen te vormen (cfr. bij de CMT).



Figuur III.2.1- Verstrooiingsintensiteit voor drie Pluronic® F127 concentraties in functie van de temperatuur. (X) 10 mg/ml, (■) 2.5 mg/ml, (◇) 0.1 mg/ml. De CMT waarde wordt bepaald door de intersectie van de lineaire regressielijnen vóór en na het breekpunt van de curven.

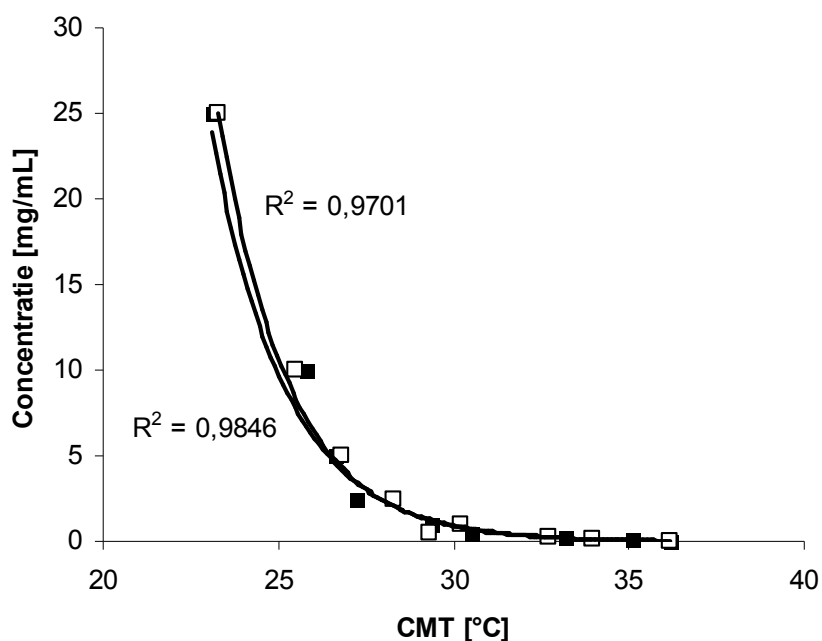
Dezelfde metingen worden herhaald voor Pluronic® F127 BMA. De waarden van de CMT, gevonden voor zowel de ongemodificeerde als de gemodificeerde variant van Pluronic® F127 voor de verschillende geteste concentraties worden weergegeven in Tabel III.2.2.

Tabel III.2.2 - CMT waarden voor verschillende concentraties Pluronic® F127 en Pluronic® F127 BMA (n=1).

Concentratie [mg/ml]	CMT [°C]	
	Pluronic® F127	Pluronic® F127 BMA
0.05	36.18	36.15
0.10	35.10	33.95
0.25	33.20	32.70
0.50	33.20	29.30

1.00	29.35	30.20
2.50	27.20	28.30
5.00	26.65	26.80
10.00	25.80	25.49
25.00	23.10	23.30

Als deze waarden ten opzichte van elkaar uitgezet worden (Figuur III.2.2), worden er overeenstemmende curven bekomen met een hoge graad van overeenstemming.



Figuur III.2.2 - Exponentieel verband tussen de temperatuur en de kritische micelconcentratie. (●)Pluronic® F127(□)Pluronic® F127 BMA.

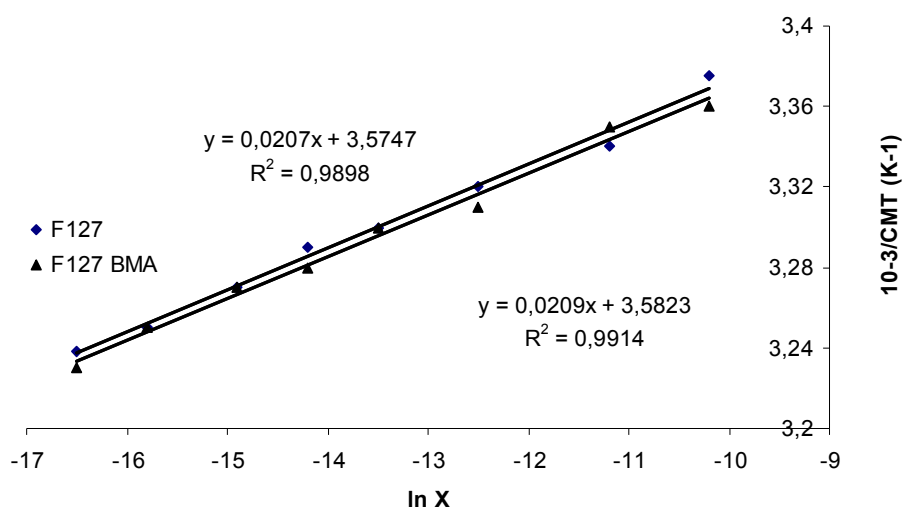
Uit de thermodynamica van het 'closed association' model voor de micelvorming beschreven in paragraaf III.2.1, kan worden nagegaan of de experimentele resultaten de gemodelleerde afleidingen voor de micelthermodynamica volgen. Uit dit model blijkt dat:

$$\Delta H^{\circ} = R[\delta \ln (X)/\delta(1/CMT)]_p \quad [III.9]$$

Anders kan ook geschreven worden dat:

$$1/\text{CMT} = R/\Delta H^\circ \ln(X) + \text{cte} \quad [\text{III.10}]$$

Dit resulteert in een lineair verband bij uitzetting van $1/\text{CMT}$ in functie van het natuurlijke logaritme van de concentratie in molfractie eenheden. Uit de helling van de curve kan de micelvormingsenthalpieverandering afgeleid worden gezien ze staat voor $R/\Delta H^\circ$. Deze plots voor Pluronic® F127 en Pluronic® F127 BMA worden weergegeven in Figuur III.2.3.



Figuur III.2.3 - Reciproke waarde voor de CMT versus de copolymeer concentratie $\ln X$ (in molfractie eenheden). Uit de helling van deze plot kan de micellisatie-enthalpie afgeleid worden, die op zijn beurt toegang geeft tot diverse thermodynamische parameters.

Voor een 1% (g/v) oplossing van de al dan niet gemodificeerde Pluronic® F127 blokcopolymeren worden de thermodynamische parameters bij hun respectievelijke kritische miceltemperatuur weergegeven in Tabel III.2.3.

Tabel III.2.3 - Thermodynamische parameters voor het micel-vormingsproces van 1% (g/g) oplossing bij hun respectievelijke CMT (n=3).

	Pluronic® F127	Pluronic® F127 BMA
ΔH°	$369 \pm 7 \text{ kJ.mol}^{-1}$	$363 \pm 8 \text{ kJ.mol}^{-1}$
ΔS°	$1.328 \pm 22 \text{ kJ.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$	$1.335 \pm 25 \text{ kJ.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$
ΔG°	$-27.7 \pm 2.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$	$-26.8 \pm 3.1 \text{ kJ.mol}^{-1}$

De verschillen tussen de thermodynamische parameters weergegeven in Tabel III.2.3 kunnen als niet significant ($p < 0.05$) verschillend beschouwd worden. De chemische modificatie van de Pluronic® F127 hydroxyleindgroepen heeft geen invloed op het micelvormingsproces. Dit ligt in lijn met de verwachtingen, aangezien de eindgroepmodificatie relatief klein is ten opzichte van de veel grotere Pluronic® keten. Deze waarden voor de thermodynamische parameters zijn vergelijkbaar met de waarden voor Pluronic® F127, gepubliceerd door Pandit et al (262).

III.2.4. Invloed van de chemische eindgroepmodificatie van Pluronic® F127 op de micelgrootte.

Informatie over de dimensies van de gevormde micellen kan verkregen worden door dynamische lichtverstrooiingsmetingen (DLS) (263). Gezien micellaire systemen onderhevig zijn aan Brownse bewegingen, wordt de Rayleigh-verstrooiing beïnvloed en resulteert dit in fluctuaties van de intensiteit van het verstrooide licht. Deze fluctuaties worden gemeten via DLS en in relatie gebracht met de diffusiecoëfficiënt door middel van een wiskundige functie; namelijk de autocorrelatie. Uit deze functie wordt eerst de vervalconstante berekend. Deze grootheid wordt vervolgens gebruikt om de diffusiecoëfficiënt te berekenen (261).

$$D = \frac{1}{2 \tau \kappa^2} \quad k = \frac{4 \pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad [\text{III.7}]$$

met: n	= brekingsindex
λ	= golflengte van het invallend licht
θ	= hoek waaronder het verstrooide licht wordt gemeten
τ	= vervalconstante

Aan de hand van de Stokes-Einstein vergelijking kan dan uiteindelijk de hydrodynamische diameter ($2 R_h$) van de partikels berekend worden (261).

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D_0} \quad [\text{III.8}]$$

Waarin:

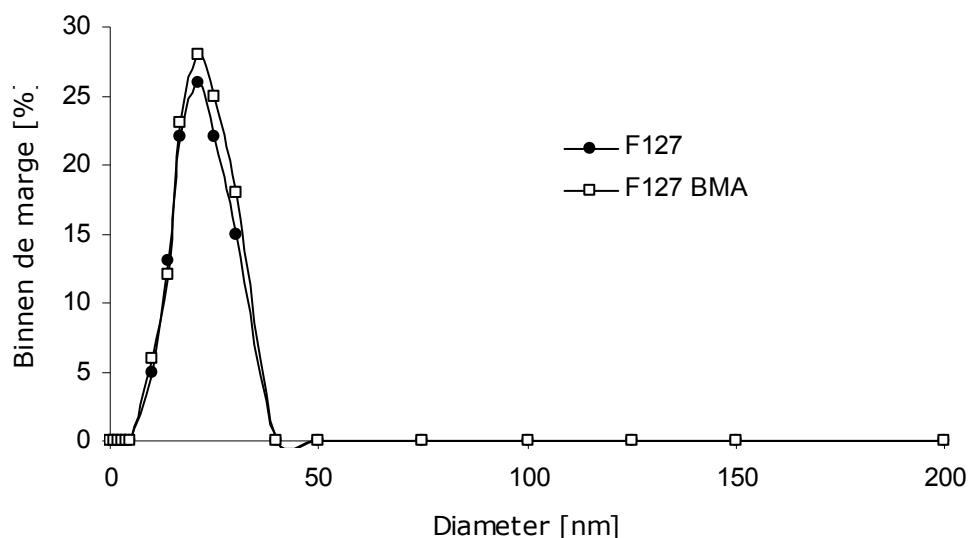
k_B	= Boltzmann constante (1.38.10 ⁻²³ J/K)
T	= absolute temperatuur (K)
η_0	= viscositeit van het solvent (cP)
D_0	= diffusieconstante bij oneindige verdunning

Bij dynamische lichtverstrooiingsmetingen wordt de deeltjesgrootte niet rechtstreeks gemeten. Er wordt een grootte gemeten die eigen is aan een deeltje, waaruit vervolgens de diameter onder dezelfde omstandigheden kan berekend worden.

De deeltjesgrootte wordt gemeten voor het niet-gemodificeerde Pluronic® F127 en voor Pluronic® F127 BMA. Bij 30°C zijn er in alle oplossingen micellen aanwezig daar ze boven de CMT ligt voor de aangewende concentratie. De lichtverstrooiing wordt telkens gemeten onder een hoek van 90°C. In huidig werk wordt gebruik gemaakt van de CONTIN methode ("Non-Negatively Constrained Least Squares") voor de analyse van de autocorrelatie-functie. Deze optie in de deeltjesgrootte-distributiesoftware wordt algemeen gebruikt voor de studie van Pluronic® micellen via DLS (137, 264). Uit het analyserapport worden drie verschillende distributies verkregen, gebaseerd op intensiteit, volume en aantal.

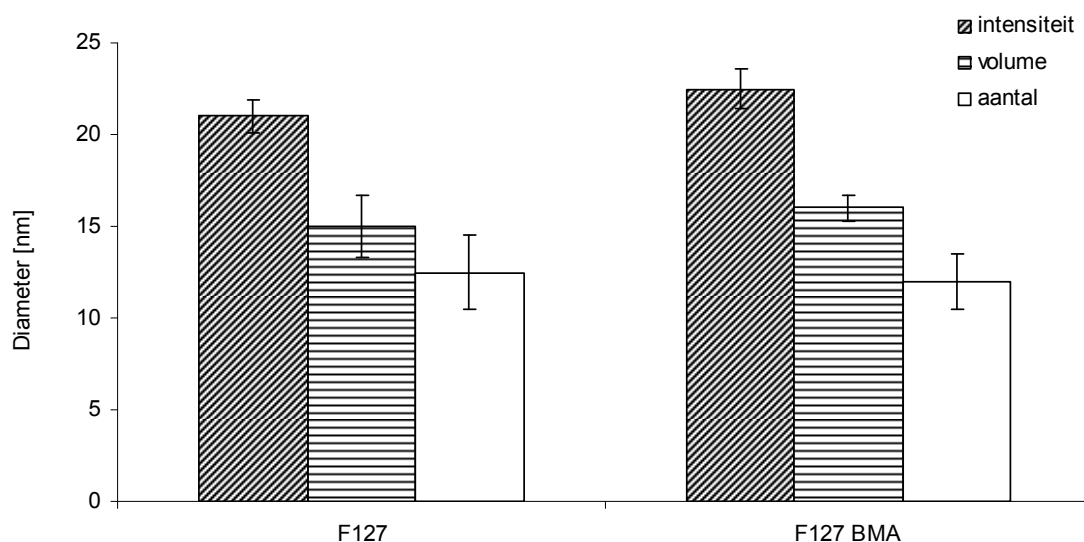
Een intensiteitsverdeling houdt vooral rekening met de intensiteit van het verstrooide licht. Aangezien de intensiteit van dat licht evenredig is met de zesde macht van de deeltjesstraal, zijn de enkele grote deeltjes veel zichtbaarder dan de vele kleine deeltjes. Hierdoor kan de gemiddelde diameter groter zijn dan in realiteit. De volumeverdeling houdt rekening met het volume van de deeltjes, waardoor de grote deeltjes het schijnbaar gemiddelde eveneens kunnen verhogen. De laatste verdeling, die gebaseerd is op het aantal deeltjes verwaarloost de grotere deeltjes aangezien ze in veel kleinere aantallen voorkomen, waardoor de deeltjesgroottedistributie een lagere waarde weergeeft. Indien tot dezelfde waarde gekomen wordt volgens de drie verschillende distributies, dan wordt gesproken van een homogene deeltjesgrootte. In de praktijk komt het neer op drie verdelingen die slechts weinig verschillen in gemiddelde deeltjesdiameter.

De invloed van de chemische modificatie van de eindgroep op de miceldiameter wordt weergegeven in Figuur III.2.4, welke de intensiteitsverdeling van de hydrodynamische diameter weergeeft. Ook na modificatie komen er nog micellen voor in een monomodale verdeling zonder de aanwezigheid van grotere aggregaten. Ze bezitten een vergelijkbaar maximum en hebben geen significant verschil in polydispersiteitsindex (PDI 1.43). Er kan duidelijk een monomodale verdeling van de micelgrootte waargenomen worden met een gemiddelde waarde van $21 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$. Prud'homme et al (265) maakten gebruik van small angle neutron scattering (SANS) om de micellen van Pluronic® F127 te karakteriseren. Uit deze studies kan opgemaakt worden dat dit overeenkomt met een aggregatienummer van 48 ± 2 . Een aggregatienummer is een beschrijving van het aantal moleculen die aanwezig zijn in een micel eens de kritische micelconcentratie (CMC) bereikt is. Meer specifiek wordt deze gedefinieerd als het gemiddelde nummer van surfactantmonomeren in een sferische micel (266). Er werd tevens bewezen dat de straal van de micelkern ($\sim 4.4 \text{ nm}$) en het aggregatiegetal van de micellen onafhankelijk zijn van de polymeerconcentratie en de temperatuur.



Figuur III.2.4 - Distributie van de miceldiameter van de Pluronic® F127 en BMA derivaten waarbij een contin analyse werd aangewend volgens de intensiteitsverdeling.

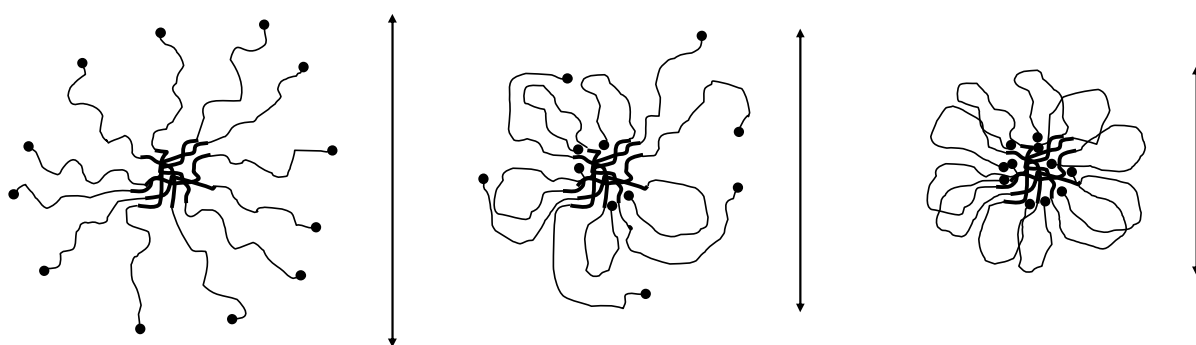
De gemiddelde waarden van de metingen worden weergegeven in Figuur III.2.5. In dit diagram wordt de verdeling geanalyseerd volgens de intensiteit, het volume en het aantal. De datareeks van Pluronic® F127 BMA verschillen niet significant ($p < 0.05$) met Pluronic® F127.



Figuur III.2.5 - Overzicht van de gemiddelde miceldiameter van Pluronic® F127 en Pluronic® F127 BMA, gemeten via DLS en geanalyseerd via de contin benadering, met de weergave van de intensiteits-, volume en de getal gemiddelden ($n=3$).

Uit de metingen blijkt dat de chemische modificatie van de hydroxylgroepen geen significante ($p < 0.05$) vergroting van de miceldiameter tot gevolg heeft. In het werk van I. Swennen (267), werd voor de Pluronic® F127 depsipeptidederivaten een significante vergroting waargenomen van de miceldiameter. Dit kan men toeschrijven aan de omvang van de de eindstandige groepen.

Het is belangrijk dat de polymeriseerbare eindgroepen beschikbaar zijn voor latere intermicellaire radicalaire vernettingsreacties die aanleiding geven tot een driedimensioneel polymeernetwerk. Daarom bestaat er de mogelijkheid dat door een verandering van de polariteit van de eindgroepen, deze niet meer beschikbaar zijn aan het oppervlak van de micel, maar eerder de hydrofobe omgeving van de micellen zouden prefereren. Dit resulteert in een dalende miceldiameter omdat er een soort 'flower-micel' (137) zou ontstaan.



Figuur III.2.6 - Verkleinen van de miceldiameter onder invloed van de graad van het terugplooien van de eindgroepen in de micelkern. Uiteindelijk wordt een flower-micel verkregen (rechts).

De toename van de diameter in de intensiteitsmode kan verklaard worden door de toegenomen lengte van de hydrofiele blokken, die bepalend is voor de straal van de micelcorona of eventueel door een toename in het aggregatiegetal. Hierdoor is de hypothese van de 'flower-micel' en de bijgaande verkleinde miceldiameter niet van toepassing.

III.3. Geleringseigenschappen van PEO-PPO-PEO blokcopolymeren.

III.3.1. Inleiding.

Pluronic[®] zijn in staat een fysische gel te vormen door het opwarmen van geconcentreerde waterige oplossingen (268). Deze fysische gelering uit zich door een plotse toename in de viscositeit van de polymeer/water systemen (137-141).

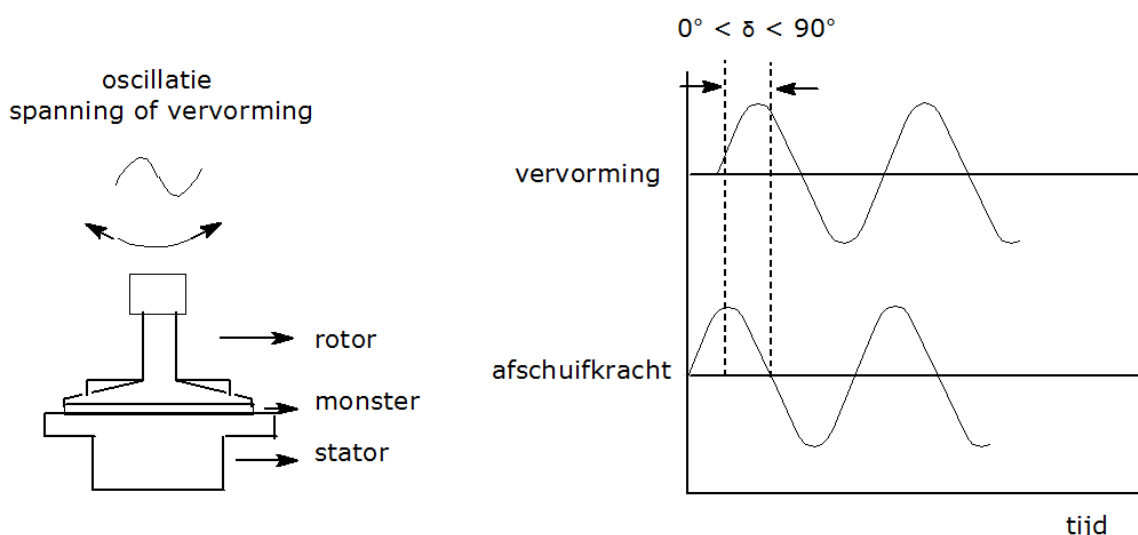
Verschillende mechanismen worden reeds voorgesteld als drijvende kracht van deze thermoreversibele gelvorming. Rassing en Attwood (143) wijzen deze geltransitie toe aan intrinsieke veranderingen in de micel eigenschappen, waaronder de toename van de miceldiameter en het aggregatiegetal. Vadnere et al (145) verklaarden dat de gelvorming te wijten is aan een entropische verandering met betrekking tot lokaal geordend water in de buurt van de hydrofobe PPO ketensegmenten. De entropieverandering van de evenwichtsreactie is tegen de normale verwachting in positief aangezien er een structurering optreedt door aggregatie van hydrofobe segmenten. Maar het feit dat een grote hoeveelheid gebonden water vrijgesteld wordt, wat voor de gelering geabsorbeerd was aan het hydrofobe gedeelte, zorgt voor een enorme toename in het aantal vrijheidsgraden dat de ordening overtreft. Dit resulteert in een spontaan geleringsproces indien de temperatuur toeneemt, zodat de entropieterm ($T\Delta S$) in de eerste wet van thermodynamica de nadelige enthalpie kan overwinnen.

Wanka et al (265) en Wang en Johnston (140) speculeerden in de richting van een geordende driedimensionele toestand of netwerkvorm van de micellen. Deze studie bewijst dat de toename in viscositeit gepaard gaat met een "hard sphere crystallization". Experimenteel kon vastgesteld worden dat dit punt overeenkomt met het overschrijden van de kritische micel volume fractie van 0.53 (bolstapeling van de micellen). Bij verdere temperatuursverhoging kan er een nieuwe fasentransitie waargenomen worden welke overeenkomt met het smelten van de fysische hydrogel. Bij deze hogere temperaturen worden de kristallijne domeinen verstoord door de contractie van de micellen, waardoor de viscositeit van de polymeer/wateroplossing weer drastisch verlaagd wordt (193, 232).

Door het verdwijnen van de kristaldomeinen gaan tevens de fysische knooppunten van het netwerk verloren. Het temperatuursgebied waarin de fysische gellen stabiel zijn is evenredig met de polymeerconcentratie. Indien de concentratie hoger is dan 35% (g/g) kan het smelten van de gellen niet waargenomen worden. De geltoestand gaat in deze gevallen rechtstreeks over in de fasenontmenging. Bij nog verder verhogen van de temperatuur (boven 100°C), wordt de ontmengingstemperatuur bereikt. Vanaf dit punt zijn zowel PPO als PEO niet meer oplosbaar in water waardoor een turbide oplossing wordt bekomen.

III.3.2. Bepaling van het visco-elastisch gedrag van hydrogelen met oscillatiereologie.

De sol-gel overgang van Pluronic® F127 oplossingen wordt bestudeerd met behulp van oscillatiereologie. Met deze techniek kan het visco-elastisch gedrag van polymeren of polymeeroplossingen in beeld gebracht worden. Voor deze metingen wordt gebruik gemaakt van twee parallelle platen waartussen de polymeeroplossingen aangebracht kunnen worden. De aangebrachte vervormingen of afschuifkrachten van de bovenste plaat ten opzichte van de onderste kunnen gestuurd worden als continu roterende bewegingen of in oscillerende bewegingen zoals weergegeven in Figuur III.3.1.



Figuur III.3.1 - Voorstelling van de sinusoidale vervormingsgolf op het materiaal tijdens een reologisch experiment.

Polymeren, polymeersmelten of oplossingen van polymeren gedragen zich echter niet als ideale vloeistoffen of vaste stoffen maar eerder als een combinatie van beide, dus 'visco-elastisch'. Een deel van de energie wordt gebruikt voor de elastische vervorming, terwijl de resterende energie verloren gaat als warmte door een viskeuze vervorming.

Om het tijdsafhankelijk visco-elastisch gedrag van materialen na te gaan, zijn dynamisch-mechanische testmethodes noodzakelijk (269). De instrumenten die hiervoor worden gebruikt kunnen sinusoïdaal veranderende krachten aanbrengen met een bepaalde amplitude en frequentie. Dit principe kan worden toegepast via oscillatietesten met een reometer. Door middel van een periodiek veranderende kracht kan onderscheid worden gemaakt tussen het elastische en het viskeuze gedrag van een materiaal na een aangebrachte spanning of deformatie (270).

Naar analogie met de wet van Hooke (271) wordt de relatie tussen de spanning en vervorming bepaald door een frequentie-afhankelijke complexe modulus $G^*(\omega)$, die in geval van visco-elastische materialen is samengesteld uit een opslagmodulus G' , volledig in fase met de aangelegde vervorming en een verliesmodulus G'' , die een faseverschil van 90° vertoont met de sinusoïdale vervorming. De moduli staan met elkaar in relatie volgens de imaginaire uitdrukking: $G^* = G' + iG''$. De opslag- en verliesmodulus kunnen als volgt uit de oscillatiemetingen achterhaald worden (271):

$$G'(\omega) = \sigma_0/\gamma_0 \cos\delta \quad [\text{III.11}]$$

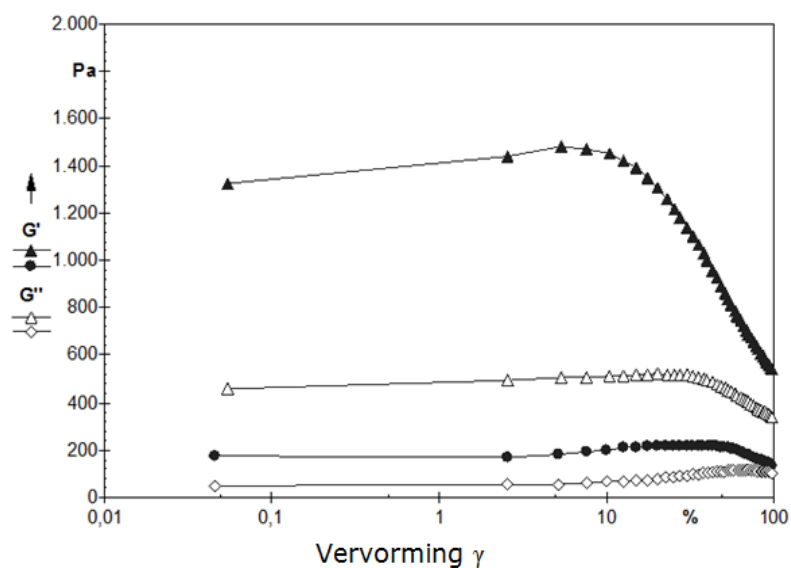
$$G''(\omega) = \sigma_0/\gamma_0 \sin\delta \quad [\text{III.12}]$$

De opslagmodulus stelt de hoeveelheid energie voor die wordt opgeslaan per cyclus (i.e. ideale vaste stof-respons), terwijl de verliesmodulus de hoeveelheid energie voorstelt die tijdens één cyclus wordt gedissipeerd (i.e. ideale vloeistof-respons). De verhouding van G' over G'' wordt de dempingsfactor genoemd en komt overeen met $\tan \delta$.

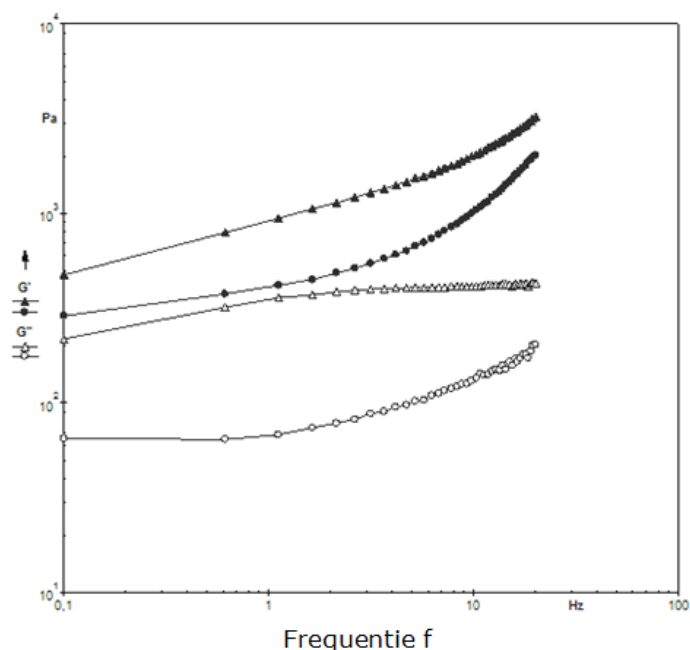
Om de visco-elastische eigenschappen van Pluronic[®] F127 oplossingen te bestuderen, is het belangrijk om het lineair visco-elastisch gebied te bepalen. Dit gebied wordt bekomen door G' en G'' in functie van de amplitude (vervorming γ) van de oscillerende beweging te

plotten. De fysische karakterisering van materialen gebeurt binnen de grenzen van dit lineaire gebied van kleine deformaties aangezien de interne structuur van de materialen op deze manier behouden blijft.

Voor de bepaling van het visco-elastisch gebied werd een 'amplitude sweep' uitgevoerd voor drie verschillende Pluronic® F127 concentraties (Figuur III.3.2). Het gebied waar de opslagmodulus constant blijft in functie van de amplitude (uitgedrukt in elongatie) is duidelijk waarneembaar voor de drie verschillende polymeerconcentraties. De sterkte van de gelen, evenredig met de opslagmodulus, neemt logischerwijs toe met de toenemende polymeerconcentratie. De lengte van het visco-elastisch gebied is vergelijkbaar voor de verschillende Pluronic® F127 concentraties. Door toename van de vervorming van 0,05 tot 1% blijft G' lineair en G'' quasi lineair. Op basis van deze resultaten werd 0.5% geselecteerd voor alle dynamische metingen.



Figuur III.3.2 - Bepaling van het lineair viscoelastisch gebied voor Pluronic® F127-oplossingen bij 37°C. ▲ G' 30% (g/g) oplossing, Δ G'' 30% (g/g) oplossing, ● G' 20% (g/g) oplossing, ○ G'' 20% (g/g) oplossing.

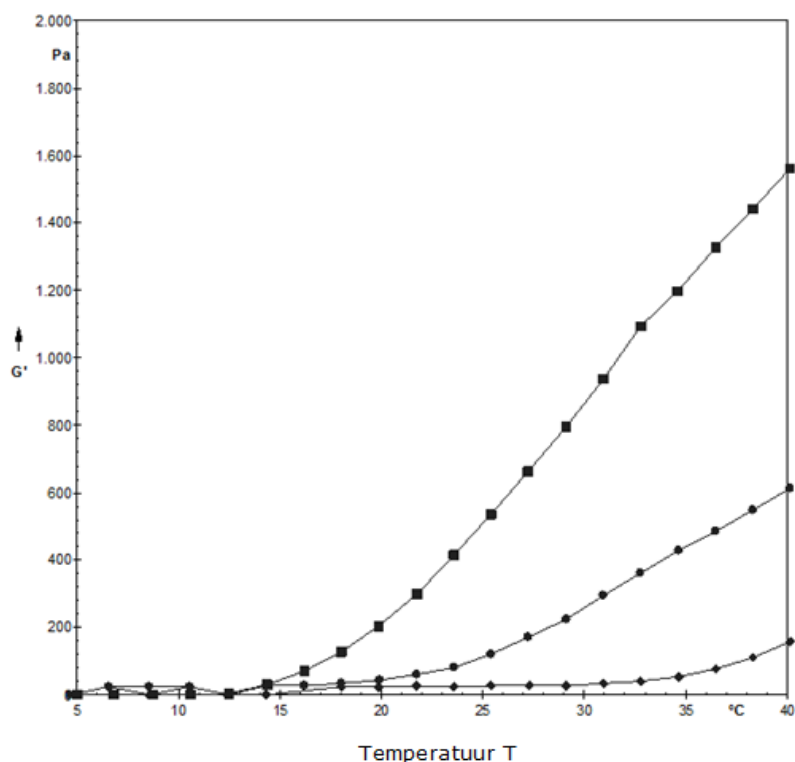


Figuur III.3.3 – Frequentie-afhankelijkheid van Pluronic® F127 oplossingen bij 37°C, bij aanwenden van een vervorming van 0.5%. ▲ G' 30% oplossing, Δ G'' 30% oplossing, ● G' 20% oplossing, ○ G'' 20% (g/g) oplossing

De frequentie-afhankelijkheid van de fysisch vernette systemen wordt eveneens bestudeerd. Binnen het frequentie-interval van 0,1 tot 20 Hz wordt slechts een kleine frequentie-afhankelijkheid van G'' vastgesteld (zie Figuur III.3.3). Bijgevolg wordt voor alle experimenten een frequentie van 3 Hz als standaard aangewend.

De gelvorming van Pluronic® F127 oplossingen in water wordt bestudeerd met oscillatie reologie (3 Hz, 0,5%) door een temperatuursprogramma. Alle metingen zijn uitgevoerd met een normaalkracht gelijk aan 0 N. Zoals weergegeven in Figuur III.3.4 wordt bevestigd dat met een stijgende polymeerconcentratie, de gellingstemperatuur daalt en de gelsterkte stijgt, zoals vertaald door de hogere G' . De complexe viscositeit van de polymeeroplossing volgt het verloop van de opslagmodulus gedurende het doorlopen temperatuursinterval. De metingen werden uitgevoerd tot een maximale temperatuur van 40°C. Dit had enerzijds te maken met het uitdrogen van het staal bij hogere

temperatuur (ondanks het gebruik van glycerol). Anderzijds is een temperatuur hoger dan de fysiologische niet relevant voor de binnen dit doctoraat beoogde toepassingen.

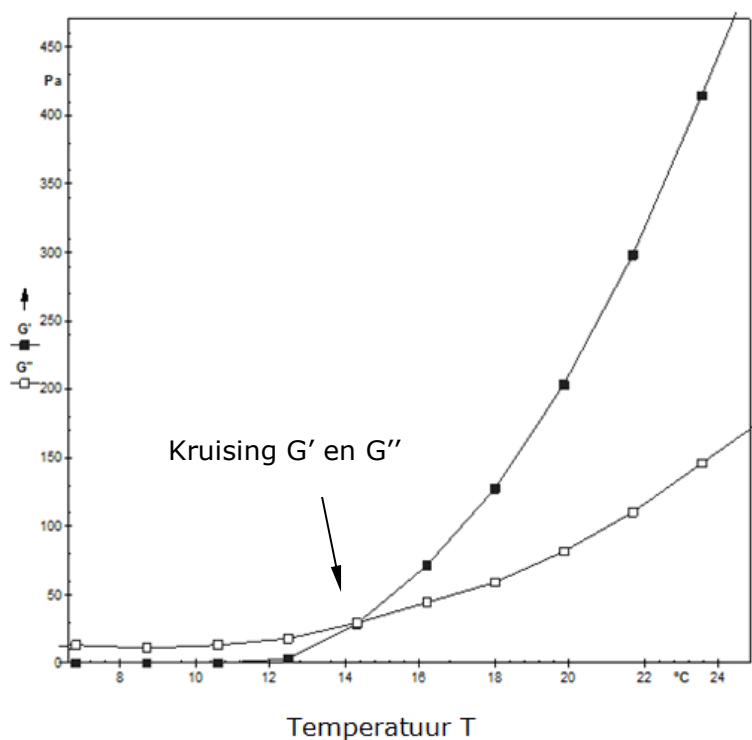


Figuur III.3.4 - Thermische gelering van Pluronic® F127 oplossingen gemeten met oscillatie reologie (3 Hz, 0,5%, 0 N). ■ G' 30% (g/g) oplossing, ● G' 25% (g/g) oplossing, ♦ G' 20% (g/g) oplossing

De geleringstemperatuur kan uit deze data op verschillende manieren geïnterpreteerd worden. Vanuit de reologische studie van thermoset harsen kan de geleringstemperatuur beschouwd worden als het punt waar G' en G'' gelijk worden. Brown et al (137, 272) maakten eveneens van deze aanpak gebruik om de geleringstemperatuur van PEO-PPO-PEO oplossingen te bepalen. In de sol toestand bevindt het systeem zich in de vloeistof toestand waarin de viskeuze respons groter is dan de elastische. Dit heeft tot gevolg dat G'' groter is G' . Echter, wanneer de fysische netwerkstructuur zich vormt, krijgt het systeem eerder de eigenschappen van een vaste stof, met een grotere bijdrage van de elastische component, (i.e. de opslagmodulus) tot gevolg in vergelijking met de viskeuze component van de complexe modulus G^* . Door deze abrupte verandering dienen beiden elkaar dus te kruisen. De software van de reometer is in staat dit snijpunt te berekenen

wat dus beschouwd kan worden als de gelingstemperatuur voor de betreffende polymeerconcentratie.

Zoals aangetoond in de publicatie van Winter en Chambon (273) is de enige juiste manier om een gelpunt te bepalen met reologie door een frequentie sweep uit te voeren. Hierbij gaat men kijken bij welke tijd $\tan(\delta) = G''/G'$ onafhankelijk is van de frequentie. Echter dient bij een frequentie sweep de geling voldoende traag te verlopen om een $G'G''$ spectrum te meten bij een gegeven frequentie. Uit de frequentie sweep experimenten (zie Figuur III.3.3) kan men afleiden dat de frequentie niet constant is, waardoor het Winter-Chambon (WC) criterium niet geldig is. Hierdoor dienen we het kruisingspunt met enige nuance te benaderen (274).

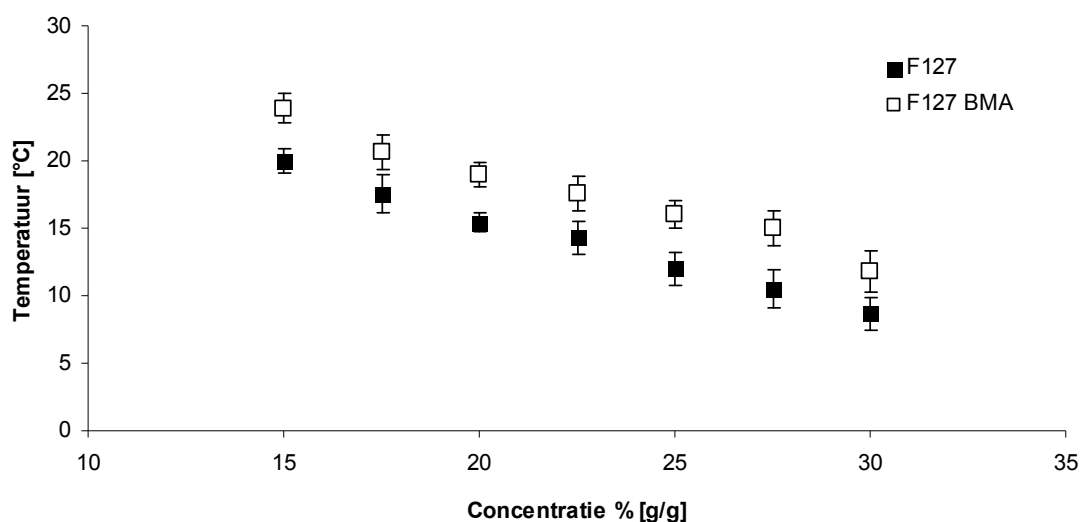


Figuur III.3.5 - Bepalen van de gelingstemperatuur via het kruisingspunt punt van G' (■) en G'' (□) van een 30% (g/g) oplossing Pluronic® F127 BMA.

Een voorbeeld voor een 30% (g/g) oplossing Pluronic® F127 BMA wordt geïllustreerd in Figuur III.3.5. Opmerkelijk is dat het geleringspunt een viertal graden Celsius lager gesitueerd is. Dit kan geïnterpreteerd worden als het punt waar de ketenverstrengelingen zich vormen en een materiaal gevormd wordt waarvan de elastische component de

viskeuze overstijgt, dus waar het materiaal eerder als vaste stof dan als vloeistof dient beschouwd te worden. De eigenlijke toename in viscositeit, gekarakteriseerd door een zeer sterke toename in G' , gebeurt slechts bij verdere temperatuursverhoging waarbij het micel-kristalrooster wordt opgebouwd.

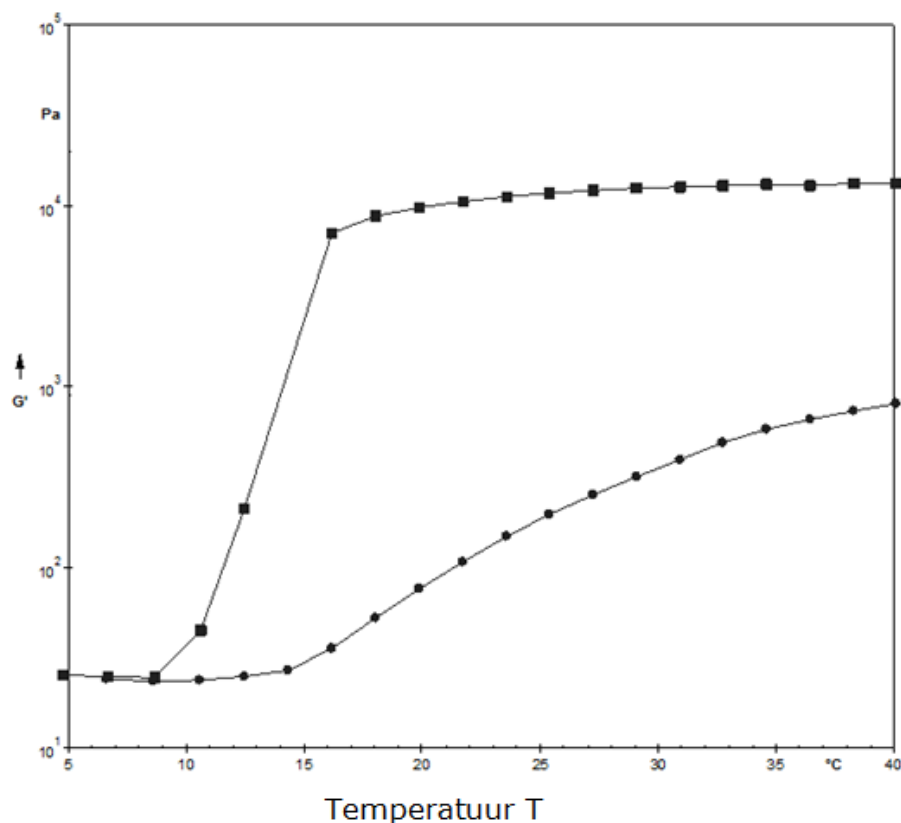
Uitgaande van de hierboven vermelde resultaten kan er een fasendiagram opgesteld worden vóór en na chemische modificatie. De intersectie tussen G' en G'' voor verschillende polymeerconcentraties variërend van 15 tot 30% (g/g) met een intervalgrootte van 2%, werd bepaald voor zowel het niet gemodificeerde Pluronic® F127 als voor Pluronic® F127 BMA. De invloed van de chemische eindgroepverandering op Pluronic® F127 is weergegeven in Figuur III.3.6.



Figuur III.3.6 - Sol-gel fasendiagram van Pluronic® F127 en Pluronic® F127 BMA voor verschillende concentraties (n=3).

De modificatie van de eindgroep van Pluronic® F127 heeft een significante ($p < 0.05$) invloed op het fysische geleringsproces. Niet enkel is er een verhoging van de gelingstemperatuur van 3 tot 4 graden Celsius waarneembaar, alsook wordt de sterkte van de gelen sterk verminderd zoals aangegeven door de lagere waarden voor G' voor Pluronic® F127 BMA (Figuur III.3.7). Deze invloed is onverwacht aangezien er weinig

verschillen waarneembaar zijn in het micel-vormingsgedrag. Het modificeren van de eindgroep verstoort in een niet onbelangrijke mate de fysische gelering van PEO-PPO-PEO-blokcopolymeren. De bekomen resultaten liggen in dezelfde lijn met de bevindingen van I. Swennen (267) voor Pluronic® F127 depsipeptidederivatten.



Figuur III.3.7 - Vergelijking tussen het geleringsgedrag van Pluronic® F127 en Pluronic® F127 BMA bij 37°C, ■ G', 30% (g/g) oplossing Pluronic® F127, ● G' 30% (g/g) oplossing Pluronic® F127 BMA.

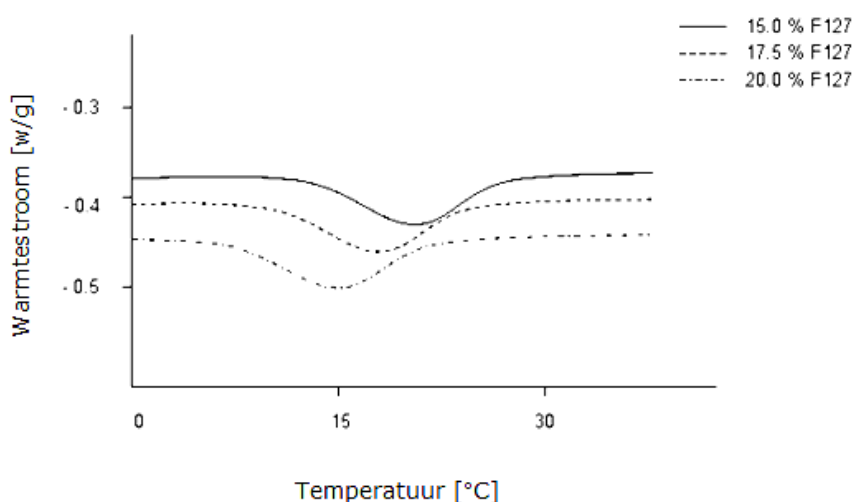
De factor die fysische gelering veroorzaakt, is de stapeling van de micellen in een kristalrooster indien een kritische micel volumefractie van 0.53 overschreden wordt. Door de kleine toename in miceldiameter na chemische modificatie (zie paragraaf I.5.2) is het eventueel mogelijk dat de temperatuur waarbij de micellen 53% van het totale volume innemen pas bij hogere waarden plaatsvindt.

III.3.3. Calorimetrische studie van de sol-gel transitie van Pluronic®.

Naast reologie wordt eveneens gebruik gemaakt van DSC om de gelling van Pluronic® F127 oplossingen in water in beeld te brengen. De DSC-apparatuur bevat naast elkaar gelegen, gelijke compartimenten voor monster en referentie. Het referentie compartiment bevat een leeg, gesloten aluminium pannetje. In het monster compartiment wordt eenzelfde gesloten aluminium pannetje geplaatst, gevuld met 10-15 mg staal. Het staal wordt met een gecontroleerde snelheid verwarmd. Er wordt een grafiek weergegeven waarin de warmtetoevoer tegen de temperatuur wordt uitgezet. De verkregen thermische scan wordt vervolgens geanalyseerd.

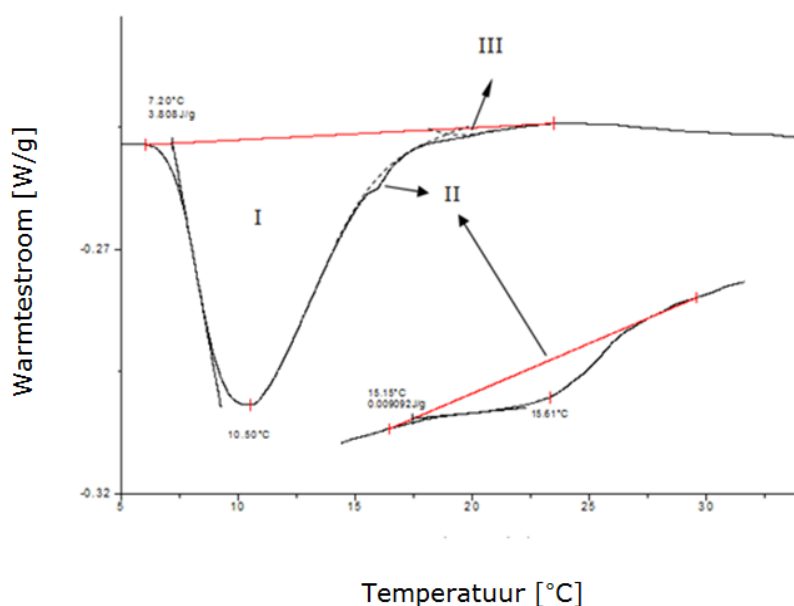
De temperatuurspiek in een warmtecurve stemt overeen met het gel 'smeltpunt' T_{gel} en het oppervlak onder de piek met de enthalpie van geleren. Belangrijk om op te merken is dat er hysteresis zal optreden in het gelgedrag. Hierbij zal de gel naar sol transitie (smelten) niet perfect samenvallen met de sol naar gel overgang.

Een voorbeeld van DSC thermogrammen van verschillende Pluronic® F127 oplossingen wordt weergegeven in Figuur III.3.8. Bij opwarmen van de oplossingen van 0 tot 40 graden Celsius wordt er een duidelijke endotherme piek waargenomen die verschuift naar lagere temperaturen bij stijgende polymeerconcentraties.



Figuur III.3.8 – DSC thermogrammen van Pluronic® F127 oplossingen in water voor een concentratiegebied van 15 tot 20% (g/g) (n=1) met een opwarmsnelheid van 2°C/min.

Om de endotherme signalen te verklaren wordt een detailweergave van een 25% (g/g) oplossing van Pluronic® F127 weergegeven in Figuur III.3.9. Uit deze figuur blijkt dat de curve opgebouwd is uit een overlap van drie verschillende signalen (I tot III). Het voornaamste signaal, weergegeven als I in het thermogram, staat voor de endotherme unimeer naar micel transitie zoals beschreven in paragraaf III.2. Deze transitie is verantwoordelijk voor het merendeel van de gemeten transitie-enthalpie van ± 3.8 J/g polymeeroplossing. Signalen II en III leveren in vergelijking met signaal I een bijna verwaarloosbare bijdrage tot de gemeten enthalpie. Uit literatuurgegevens (137) blijkt dat transities II en III toegewezen kunnen worden aan respectievelijk de fysische gelinging van de polymeeroplossing en de reorganisatie van de micellen in de geltoestand.



Figuur III.3.9 - DSC thermogram van een Pluronic® F127 oplossing 25% (g/g) met een opwarmsnelheid van 5°C/min.

Door het voorkomen van het endotherm signaal bij de gelinging van Pluronic® F127 oplossingen is het mogelijk om deze techniek te gebruiken voor de evaluatie van de gelingingstemperatuur. In vergelijking met reologie is het gebruik van DSC zeer interessant gezien beperkte monsterhoeveelheden volstaan. Echter zal door de geringe intensiteit van het signaal de sol-gel transitie enkel duidelijk detecteerbaar zijn vanaf een

polymeerconcentratie van 25% (g/g). Om een overzicht te geven, worden de gelingstemperaturen voor een 25, 27.5 en een 30% (g/g) oplossing bekomen via DSC en reologie getoond in Tabel III.3.1. De temperatuur bij de 'onset' van het endotherme signaal dat staat voor de sol-gel transitie wordt gekozen als de gelingstemperatuur.

Tabel III.3.1 - Gelingstemperatuur van verschillende Pluronic® F127 oplossingen gemeten via DSC en reologie (n=3).

	Gelingstemperatuur [°C]		
	Polymeerconcentratie Pluronic® F127		
	25% (g/g)	27.5% (g/g)	30% (g/g)
Reologie G' X G''	14.55 ± 1.22	10.55 ± 1.02	9.3 ± 0.85
DSC	15.22 ± 1.18	13.35 ± 1.15	11.52 ± 1.14
Reologie viscositeit	18.30 ± 0.98	14.69 ± 0.96	12.80 ± 1.21

Uit de vermelde waarden kan opgemaakt worden dat de gelingstemperatuur gemeten via DSC zich situeert tussen de gelingstemperaturen gemeten via reologie volgens de twee verschillende interpretatiemethodes van het geleringspunt. Duidelijk is dat dezelfde trend vastgesteld wordt in alle datareeksen. Gezien de kleine monsterdimensies voor de DSC metingen en het feit dat de DSC data in relatie te brengen zijn met de gegevens verkregen uit reologie experimenten, werd van deze techniek gebruik gemaakt om de invloed te bestuderen van chemische modificatie op de gelingstemperatuur voor alle Pluronic® F127 derivaten. De verschillende waarden voor de 25% (g/g) oplossingen worden weergegeven in Tabel III.3.2. Uit de analyse van deze resultaten blijkt dat de chemische modificatie van de eindgroep aanleiding geeft tot een significante ($p < 0.05$) verhoging van de gelingstemperatuur (zoals ook waargenomen in de reologie data).

Tabel III.3.2 - Gelingstemperatuur van de verschillende Pluronic® F127 derivaten (25% (g/g) oplossing), gemeten via DSC (n=3).

Type Pluronic® F127	Gelingstemperatuur 25% (g/g) oplossing [°C]
diol	15.22 ± 1.18
bismethacrylaat	17.01 ± 0.74
bisacrylaat	18.32 ± 0.35
bisamine	16.20 ± 0.42
bisacrylamide	16.89 ± 0.83
bisthioacetaat	20.21 ± 0.58
di-IPTS	19.87 ± 1.12

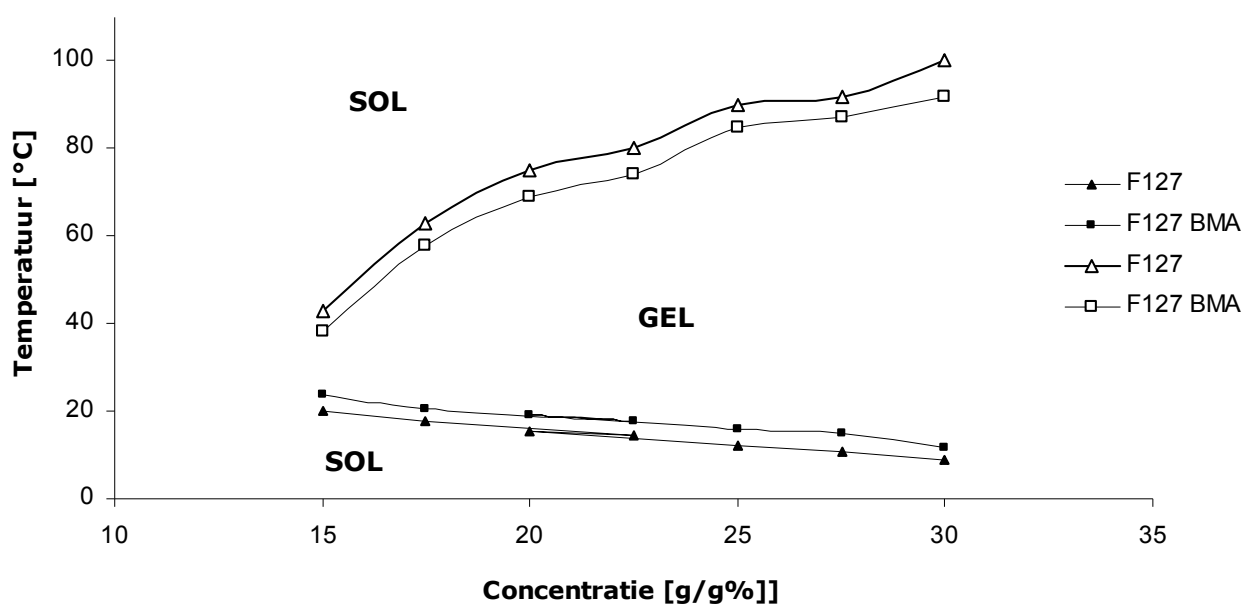
In het werk van I. Swennen (267) wordt er eveneens een significante stijging van de geleringstemperatuur voor de depsipectidederivaten van Pluronic® F127 waargenomen met een 4 tal graden Celsius. Dit ligt in lijn met de bekomen resultaten.

III.3.4. Studie van de sol-gel transitie van Pluronic® met behulp van de 'tube inversion method'.

In voorgaande paragrafen hebben we de term 'gel' in een consistente en betekenisvolle manier omschreven. Echter zal een geltoestand makkelijker te herkennen zijn dan te definiëren (if it looks like jello, feels like jello and responds like jello it must be a gel) (275). In de literatuur wordt veelvuldig gebruik gemaakt van de 'tube inversion method' voor de bepaling van de geleringstemperatuur (276).

Er werd reeds beschreven hoe fysische gellen hun integriteit verliezen door verdere verwarming van de stalen. Gezien deze temperaturen ver boven kamertemperatuur liggen, is de partiële verdamping van het water in de hydrogelen niet ondenkbaar. Deze evaporatie zorgt voor praktische problemen zowel voor DSC als voor reologie, waardoor geopteerd dient te worden voor een andere methodiek. Stalen kunnen in gesloten glazen buisjes gebracht worden, waardoor de verdamping geen probleem vormt.

Voor deze experimenten worden gellen van Pluronic® F127 en Pluronic® F127 BMA geëvalueerd. Indien aan deze data ook de gegevens uit Figuur III.3.6 worden toegevoegd, dan kan het sol-gel-sol fasendiagramma verkregen worden voor zowel de gemodificeerde als de niet gemodificeerde Pluronic® F127 gellen. De gecombineerde data zijn terug te vinden in Figuur III.3.10.



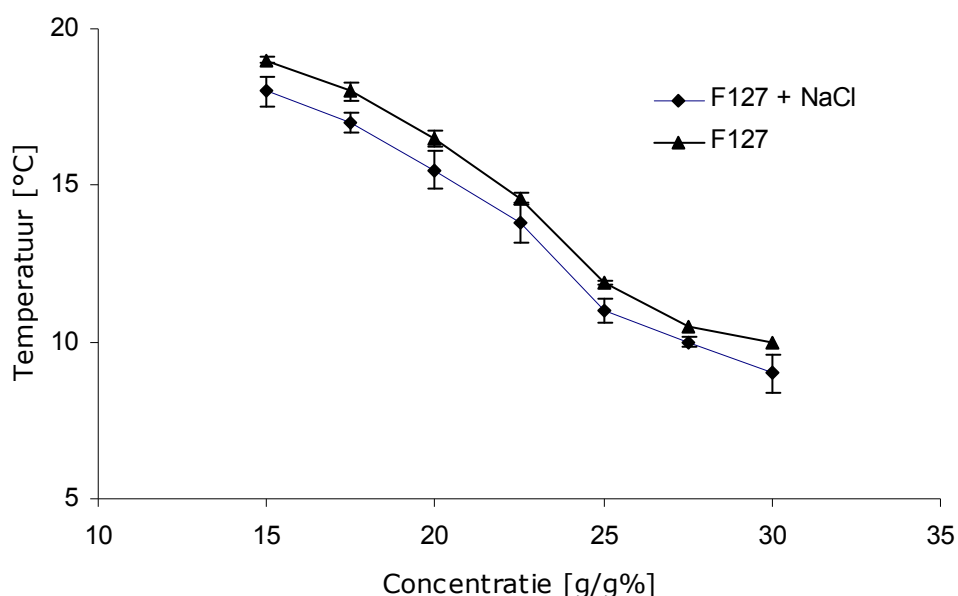
Figuur III.3.10 - Invloed van de chemische modificatie op zowel de sol-gel als de gel-sol transitie. De sol-gel overgangen zijn bekomen uit de reologiemetingen bij een toename van de viscositeit. Pluronic® F127: (●); Pluronic® F127 BMA: (□).

Uit deze metingen blijkt dat naast een verhoging van de sol-gel temperatuur een sterke verlaging van de gel-sol transitietemperatuur waar te nemen is. Hieruit kan afgeleid worden dat de chemische modificatie van de alcohol-eindgroepen zorgt voor een algemene verlaging van de thermische stabiliteit van de fysische hydrogelen. De nieuwe eindgroepen veroorzaken een reductie van het gel-gebied in het fasendiagramma. Toch blijft de typische gelering bij fysiologische omstandigheden gevrijwaard.

Calorimetrische studies zijn handig voor het direct meten van de geleringsenthalpie (smelten). De 'tube inversion method' daarentegen is een eenvoudige en populaire methode als beginpunt voor het bestuderen van het gelgedrag van hydrogelen.

III.3.4.1. Studie van de invloed van NaCl op de sol-gel transitie van Pluronic®.

Om tegemoet te komen aan de eis van Pluronic® hydrogelen als biomimetische draagstructuur, worden isotonische formuleringen getest. Deze evaluaties zijn relevant om in een latere paragraaf het fasengedrag van Pluronic® hydrogel oplossingen te bepalen bij het plotten in celcultuurmedium. Hierbij wordt het effect van een 0.9 % (g/v) NaCl oplossing op de gellingstemperatuur bestudeerd met behulp van reologie. De resultaten van deze metingen worden weergegeven in Figuur III.3.11 waarbij de lijnen staan voor de gellingstemperatuur bepaald door de kruising van G' en G'' en de viscositeitstoename door de sterke toename in G' .

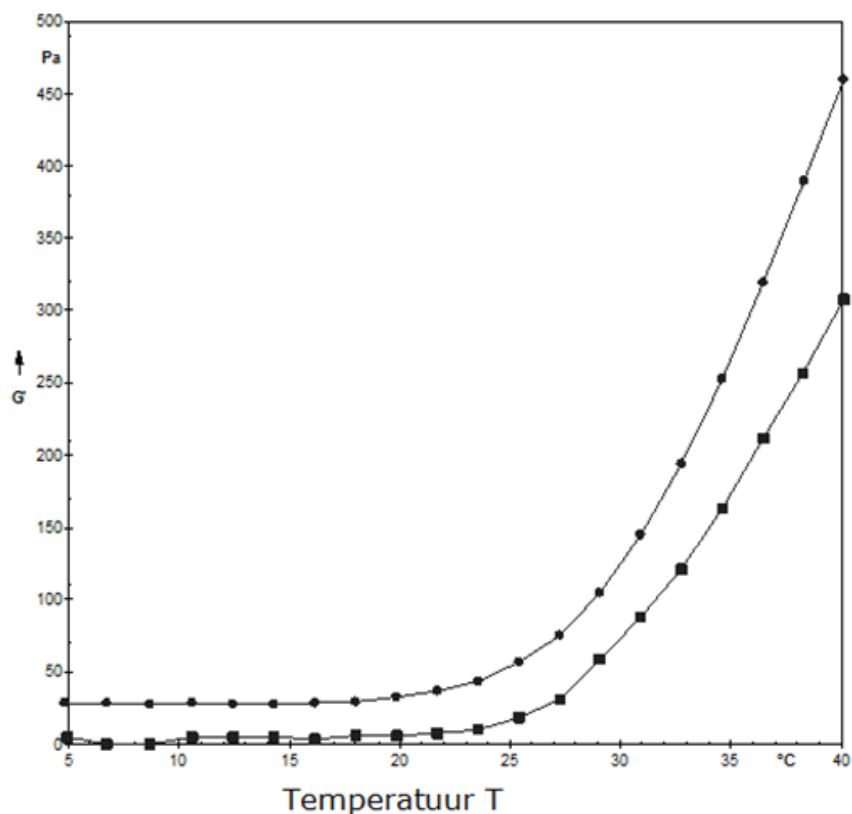


Figuur III.3.11 - Invloed van NaCl op de gellingstemperatuur van een oplossing Pluronic® F127 gemeten via reologie door de kruising van G' en G'' ($n=3$).

Het toevoegen van NaCl zorgt voor een significante ($p<0.05$) verlaging van de gellingstemperatuur, hetgeen volgens beide methodes kan vastgesteld worden en overeenstemt met de gegevens gepubliceerd door El-Kamel (277). Het toevoegen van zout in een Pluronic® oplossing zal zorgen dat het miceliseringsproces begint bij een lagere polymeer concentratie (bij constante temperatuur) of bij een lagere CMT (bij een constante concentratie) (278-280).

Door het 'salting out' effect van anionen en alkalimetaalkationen wordt de sol-gel transitietemperatuur verlaagd (281-283). Hierdoor kunnen de oplosbaarheid en de reologische eigenschappen zoals het geleringsproces van Pluronic® F127 in water beïnvloed worden door de aanwezigheid van anorganische zouten. Door de dissociatie van deze ionen in water (met als gevolg de vorming van een omringende watermantel) zijn er minder watermoleculen ter beschikking om te binden met de polymeren, waardoor het geleringsproces bij een lagere temperatuur zal plaatsvinden. Het toevoegen van zout kan een aanzienlijke verandering hebben in de structuur van micellen. Bahudur et al onderzochten uitgebreid de Pluronic® micel structuur in de aanwezigheid van zouten (278, 280, 284-285). Het toevoegen van NaCl zorgt een daling van de transitietemperatuur van sferische naar staafachtige micellen (252).

Het effect van zout toevoeging op de structuur van de micellen in Pluronic® oplossingen is in veel studies analoog bevonden aan het temperatuurseffect. De aanwezigheid van zout zal de geleringstemperatuur en het vertroebelingspunt verlagen. Een uitzondering is KCNS, deze zal het vertroebelingspunt in een aantal Pluronic® oplossingen verhogen (262, 286). Zouten spelen dus een belangrijke rol in het bepalen van de micelstructuur van Pluronic® in oplossingen.



Figuur III.3.12 - Invloed van NaCl op de gelingstemperatuur en de gelsterkte van een oplossing van Pluronic® F127 BMA gemeten via reologie.

■ G' 25% (g/g) F127 BMA + 0.9% (g/g) NaCl, ● G' 25% (g/g) F127 BMA.

In overeenstemming met Yong et al (287) wordt er eveneens een toename in de gelsterkte waargenomen door toevoeging van NaCl. Yong et al bepaalden deze gelsterkte met een fysische methode gebaseerd op de tijd dat een bepaalde massa nodig heeft om een vooraf bepaalde afstand af te leggen door de gel. In dit werk worden de reologieresultaten gebruikt omdat de opslagmodulus in relatie staat met de fysische sterkte van de gel. De toename in gelsterkte samen met de reductie in gelingstemperatuur worden geïllustreerd in Figuur III.3.12.

III.4. Conclusies.

De fysicochemische eigenschappen van een hydrogel zijn inherent verbonden met het ontwerp van een draagstructuur. Zo dient de fysische gelering behouden te blijven na modificatie om deze via de bioplotter technologie te kunnen verwerken. In dit hoofdstuk werd bestudeerd in welke mate de chemische modificatie van de Pluronic® eindgroep een invloed heeft op de fysicochemische eigenschappen van het systeem onder impuls van de lichaamstemperatuur. Hierin werd zowel gekeken naar het micel-vormingsproces als de fysische gelering.

In het eerste deel werd de invloed van chemische modificatie van Pluronic® op de miceleringseigenschappen bestudeerd. Hierbij kan men concluderen dat het Pluronic® F127 BMA derivaat een vertroebelingspunt vertoont bij een lagere temperatuur ten opzichte van Pluronic® F127. Informatie over de dimensies van de gevormde micellen werd verkregen door dynamische lichtverstrooiingsmetingen (DLS), waaruit blijkt dat de chemische modificatie geen significante vergroting van de miceldiameter tot gevolg heeft. Alsook kunnen er geen verschillen in de thermodynamische parameters waargenomen worden. Het miceleringsgedrag werd enkel bestudeerd voor het BMA derivaat. Het geleringsgedrag in de volgende stap werd gekarakteriseerd voor alle derivaten, doordat dit de belangrijkste parameter is in de finale toepassing.

De geleringseigenschappen werden bestudeerd via oscillatiereologie, dynamische differentiecalorimetrie (DSC) en de 'tube inversion method'. Hieruit blijkt dat een chemische modificatie van de eindgroep aanleiding geeft tot een significante verhoging van de geleringstemperatuur voor alle derivaten. Het geleringsgedrag bij fysiologische temperatuur blijft behouden. Het toevoegen van de fysiologische zoutconcentratie zorgt voor een verlaging van de geleringstemperatuur en een toename in gelsterkte.

IV Ontwikkeling en karakterisatie van covalent vernette Pluronic® F127 hydrogelen.

IV.1. Inleiding.

Waterige oplossingen van Pluronic® F127 die een reversibele thermische gelering kunnen ondergaan, vertonen een lage viscositeit bij omgevingstemperatuur en een uitgesproken viscositeitstoename door een kleine temperatuurstoename. Dit resulteert in een semi vaste hydrogel bij lichaamstemperatuur. Echter zal de bereikte viscositeitstoename niet groot genoeg zijn, wat resulteert in zwakke mechanische eigenschappen, beperkte stabiliteit, ... Deze nadelen zullen de hydrogelsystemen ongeschikt maken voor biomedische applicaties (249-251). In dit hoofdstuk worden verschillende vernettingsstrategieën voor de gederivatiseerde Pluronic® F127 macromonomeren besproken. Hierbij combineert men het initiële reversibele thermo-responsieve gedrag met de voordelen van een permanent, covalent netwerk dat water kan opslaan (een hydrogel). De aard van de vernettingsreacties toegepast in dit werk, kunnen onderverdeeld worden in:

- (1) UV-fotopolymerisatie (radicalaire reactie)
- (2) Michaël-type reactie (nucleofiele additiereactie)
- (3) Siloxaanreactie (condensatiereactie)

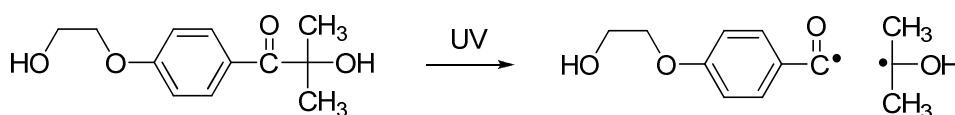
De verschillende polymerisatiestrategieën dienen milde vernettingcondities toe te laten in combinatie met cellen. Dit om in een verdere stap celencapsulatie mogelijk te maken via de bioplotter technologie.

IV.2. Vernetting van vinyl gebaseerde Pluronic® F127 macromonomeren.

IV.2.1. Irgacure 2959 als foto-initiator voor biomedische toepassingen.

De foto-initiator is een kritische component van het UV vernettingsproces (288-289). Het zal de polymerisatie initiëren om op een snelle manier een vernet product te bekomen. Als er UV licht ingestuurd wordt op een oplossing die foto-initiator bevat, zal dit geabsorbeerd worden, hetgeen aanleiding geeft tot een splitsing in reactieve fragmenten (cfr. een vrij radicaal of een kation). Het overgrote deel van de systemen zijn gebaseerd op vrije radicalen die kunnen reageren met de onverzadigde componenten (cfr. dubbele bindingen). Het emissiespectrum van de lichtbron van de lamp dient te overlappen met het absorptiespectrum van de gekozen initiator. De klasse van foto-initiatoren gebaseerd op het genereren van vrije radicalen beslaan 90% van de commercieel beschikbare soorten. Vrij radicalaire initiators kunnen beschreven worden als waterstof ontrekkende of alfa splitsende types (290).

In huidig werk wordt gebruik gemaakt van het wateroplosbare 2-hydroxy-1-[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanon) (291) als foto-initiator met als commerciële naam Irgacure 2959 (Figuur IV.2.1). Indien deze foto-initiator in lage concentraties ($\leq 0.05\%$ (w/w)) toegevoegd wordt aan een waterige oplossing kan deze molecule als niet cytotoxisch beschouwd worden (291). In dit werk maakt men gebruik van een optimaal bevonden foto-initiator concentratie van 1 mol% (292). Deze waarde ligt voor de verschillende macromonomeren beneden de grens waarbij toxiciteit wordt waargenomen.



Figuur IV.2.1 – Chemische structuur van Irgacure 2959 en de fotochemische reactie met de vorming van een α -hydroxyketon.

Er wordt gewerkt bij een golflengte van 365 nm (UVA) met de transilluminator. Dit is niet de maximale absorptie golflengte van Irgacure 2959 (276 nm - UVC), maar bevindt zich wel in de range van de excitatie. Alsook is de gekozen golflengte relatief veilig voor celencapsulatie (293) en zal UVA dieper in het substraat penetreren (294) wat kan leiden tot hogere gelfracties.

Het UV-spectrum van de zon op aarde bestaat voor 95% uit UVA (295). Het is de minst schadelijke vorm van ultraviolet licht die nauwelijks door DNA wordt geabsorbeerd (263-264). Door Bryant (291) werd bewezen dat een lichtintensiteit van 6 mW/cm² geen aanleiding geeft tot celdood en kan aanvaard worden voor klinische applicaties. Het hier gehanteerde UVA systeem opent dus eveneens mogelijkheden naar celencapsulatie toe.

Wanneer een foto-initiator geselecteerd is, is het belangrijk om te werken bij een geoptimaliseerde concentratie. Een teveel aan initiator kan even problematisch zijn als een te lage concentratie door het zogenaamde filtereffect (296), veroorzaakt door een hoge mate van vernetting aan het oppervlak. Dit zorgt ervoor dat het UV licht niet efficiënt kan penetreren doorheen de reeds gedeeltelijk gevormde hydrogel. Ook dienen we de oplossing zuurstofvrij te houden omdat zuurstof, afhankelijk van de temperatuur een radicaal inhibitor of een accelerator is, hetgeen kan interfereren met het polymerisatieproces (296). De reactie wordt gestart door het uiteenvallen van een initiator in twee radicalaire delen. Door middel van de initiator wordt de dubbele binding opengebroken (initiatie), waarbij de initiator zich aan één kant bindt. De keten zal verlengd worden door propagatie. Aan het eind van de reactie wordt de keten afgesloten door een terminatiestap. De polymerisatie kan gecontroleerd worden door het variëren van de hoeveelheid initiator, monomeerconcentratie, reactiecondities, enz ... (297).

IV.2.2. Inloed van de polymeerconcentratie op de gelfractie voor een Pluronic® F127 BMA hydrogel.

De onoplosbare fractie van de droge hydrogelen na polymerisatie wordt gedefinieerd als de gelfractie. Hierbij worden de gelen uitgeloozd en vervolgens gelyofiliseerd, waarna de gelfractie kan bepaald worden door gebruik te maken van onderstaande formule (298).

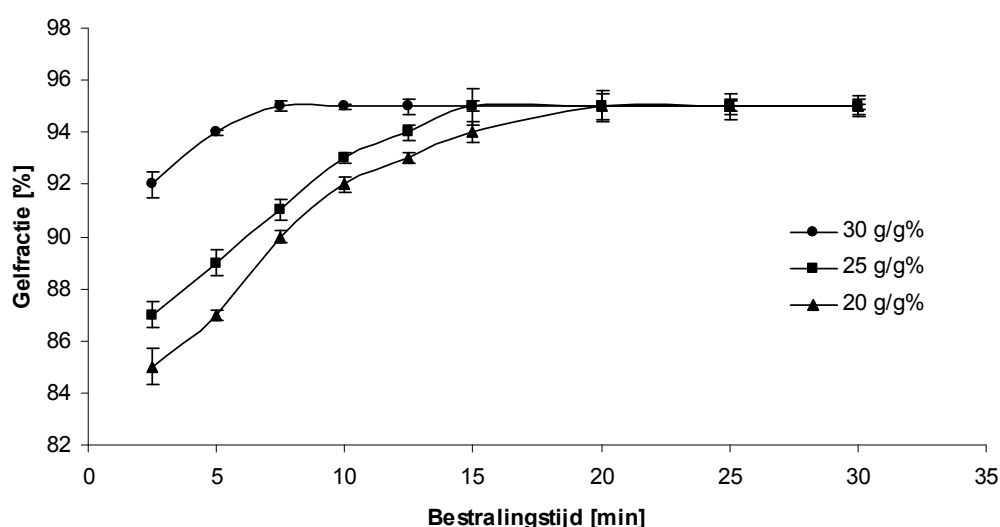
$$\text{Gelfractie [\%]} = \frac{W_d^1}{W_d^0} 100 \quad [\text{IV.1}]$$

$$\text{Solfractie [\%]} = 100 - \text{gelfractie} \quad [\text{IV.2}]$$

W_d^1 : het gewicht van de droge hydrogel na extractie

W_d^0 : het gewicht van de droge hydrogel voor extractie

In Figuur IV.2.2 is voor drie verschillende Pluronic® F127 BMA concentraties de gelfractie weergegeven in functie van de UV bestralingstijd bij aanwenden van een UV intensiteit van 5 mW/cm² en een Irgacure 2959 concentratie van 1.0 mol% ten opzichte van het aantal dubbele bindingen. Na 20 minuten wordt voor de 20% (g/g) Pluronic® F127 BMA oplossing een plateauwaarde bereikt, voor de 25% (g/g) Pluronic® F127 BMA na 15 minuten en voor de 30% (g/g) Pluronic® F127 oplossing reeds na 7.5 min.



Figuur IV.2.2 - Invloed van de polymeerconcentratie op de gelfractie voor Pluronic® F127 BMA in functie van de bestralingstijd in aanwezigheid van 1.0 mol% foto-initiator (n=3).

Men kan besluiten dat hogere concentraties aan Pluronic® F127 BMA significant ($p < 0.05$) sneller een plateauwaarde bereiken dan lagere concentraties. Dit is te verklaren door het feit dat hogere Pluronic® concentraties meer dubbele bindingen bevat, waardoor er meer radicalen gevormd worden. Een zelfde trend kan vastgesteld worden in het werk van Fairbanks et al voor PEG bisacrylaat systemen (299). Echter zal voor een acrylaat getermineerd macromonomeer de plateauwaarden sneller bereikt worden.

Voor *in vitro* en *in vivo* experimenten kan er dus gevarieerd worden met de belichtingstijd en de foto-initiatorconcentratie voor het streven naar optimale condities.

IV.2.3. Bepaling van de zwellingsisothermen voor een Pluronic® F127 BMA hydrogel.

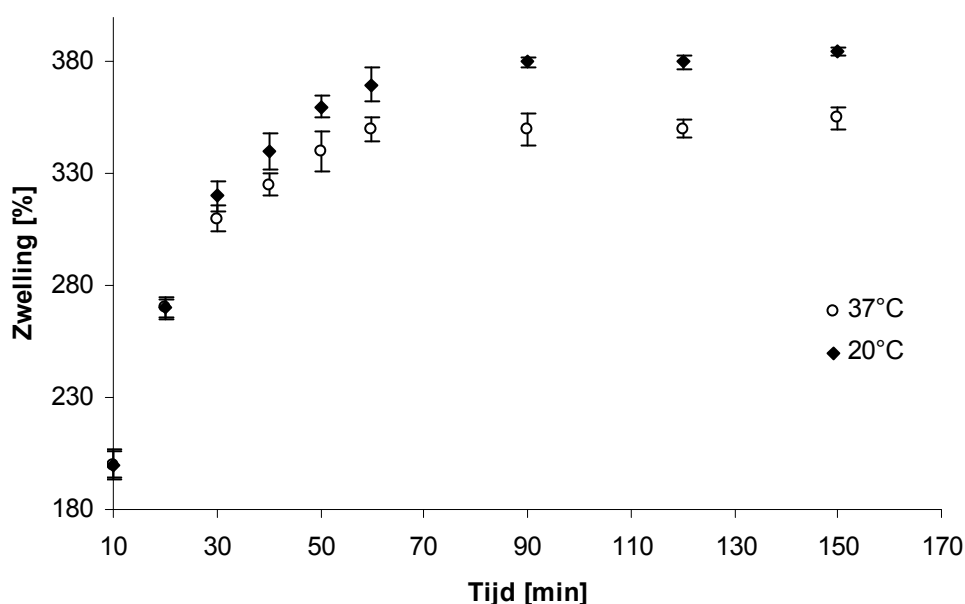
Voor het bepalen van de zwellingeigenschappen van de hydrogelen worden de gelen geïncubeerd bij 20°C of 37°C in een overmaat water. Op regelmatige tijdstippen wordt de zwellingsgraad bepaald volgens volgende formule (298):

$$\text{Zwelgraad [\%]} = \frac{W_{zw} - W_d}{W_d} 100 \quad [\text{IV.3}]$$

Waarin W_{zw} en W_d respectievelijk het gewicht voorstellen van het gezwollen en het gedroogde staal. Tijdens het zwellingsproces van een droge hydrogel worden de polymeer-polymeer interacties vervangen door sterke polymeer-water interacties. De hoedanigheid waarin een hydrogel zal zwellen is afhankelijk van de osmotische druk van het solvent en de elastische respons van de hydrogel op het opnemen van water. Een hydrogel krimpt indien de osmotische druk van het omringende solvent stijgt en neemt extra water op als er een daling van de osmotische druk plaatsvindt (300-301). Het relaxeren van de polymeerketens naar een gestrekte vorm geeft aanleiding tot een verhoging van de zwellingsgraad, terwijl overexpansie van de polymeerketens aanleiding kan geven tot krimp. Door een hydrogel tot evenwicht te laten zwellen, wordt het punt

bereikt waar de weerstand tegen diffusie van water in de gel overheerst en de wateropname maximaal is. De weerstand tegen zwellen wordt voornamelijk bepaald door het type polymeer en de vernettingsdichtheid van het materiaal.

Er worden hydrogelen bereid uitgaande van 30% (g/g) oplossingen voor Pluronic® F127 BMA met een foto-initiator concentratie van 1.0 mol% (ten opzichte van het aantal dubbele bindingen). De precursormaterialen worden gedurende 15 minuten (cfr. Figuur IV.2.2) bestraald met UVA. De zwellingsgraad wordt uitgezet in functie van de tijd bij 20 en 37°C. Aldus kunnen de zwellingsisothermen voor het vernette Pluronic® F127 BMA bekomen worden.



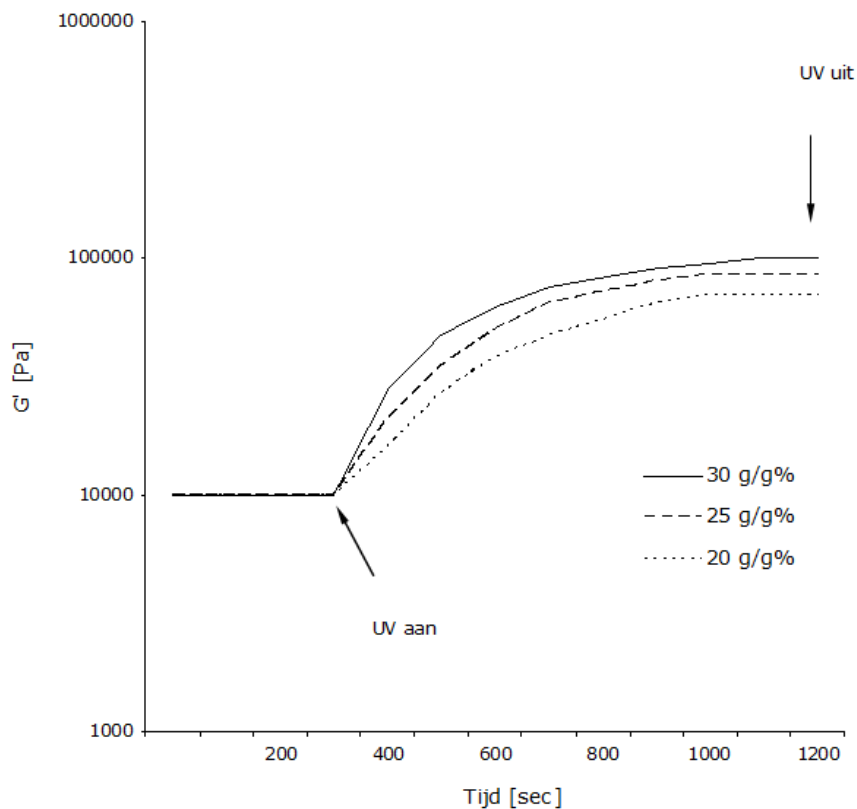
Figuur IV.2.3 – Invloed van de temperatuur op de zwellingsisothermen van een vernette 30% (g/g) Pluronic® F127 BMA hydrogel (n=3).

Uit Figuur IV.2.3 blijkt dat de temperatuur een belangrijke invloed heeft op de zwelgraad. Bij 20°C zal de hydrogel meer water absorberen dan bij 37°C, een plateauwaarde wordt bereikt na 60 min. Vanaf 50 minuten wordt er een significant ($p < 0.05$) verschil in zwelling bekomen. De bekomen evenwichtszwellingsgraad ligt na 150 min 30% hoger, waaruit blijkt dat de χ -parameter (solvent-polymeer interactie) sterk temperatuursafhankelijk is. Dit kan men verklaren doordat bij lagere temperaturen de

Pluronic® F127 BMA hydrofieler is dan bij hogere temperaturen. Deze trend wordt bevestigd door het werk van Jung et al voor TGF- β 1-geconjugeerde Pluronic® F127 derivaten (302). Hieruit kan men concluderen dat we bij het gebruik van de biplotter dienen te plotten bij 37°C om een representatieve hydrogel te bekomen voor *in vivo* of *in vitro* toepassingen.

IV.2.4. 'Real-time' evaluatie van de visco-elastische eigenschappen van een Pluronic® F127 BMA hydrogel.

De vernetting van de hydrogelen bij lichaamstemperatuur wordt bestudeerd met oscillatie-reologie waarbij de onderste parallelle plaat vervangen wordt door een glazen plaat, uitgerust met omliggende peltierplaten die de temperatuurssturing garanderen en waaronder een glasvezelkabel kan aangebracht worden. Deze lichtgeleider met een diameter van 1 cm is verbonden met een door de reometer gestuurde UV-lichtbron met instelbare intensiteit en belichtingstijd. Via deze opstelling is het mogelijk om de visco-elastische parameters te bestuderen gedurende de fotopolymerisatie van een Pluronic® F127 BMA oplossing in aanwezigheid van Irgacure 2959. De meting van de elastische component G' , gedurende dit proces wordt weergegeven in Figuur IV.2.4.



Figuur IV.2.4 – ‘Real-time’ metingen van de opslagmodulus gedurende de fotopolymerisatiereactie van verschillende Pluronic® F127 BMA concentraties bij 37°C (n=1).

Bij het begin van de meting is G' proportioneel met de polymeerconcentratie. De polymeeroplossingen bevinden zich in de fysische geltoestand. Er blijkt dat de snelheid van de G' toename (vertaalt in de helling tijdens de UV belichting) evenredig is met de polymeerconcentratie. Dit komt overeen met de vergelijking voor de polymerisatiesnelheid waarin er een evenredigheid voor het macromonomeerconcentratie kan teruggevonden worden (271-272).

$$R_p = k_p [M] \left(\frac{R_i}{2k_t} \right)^{1/2} \quad [\text{IV.4}]$$

Met:

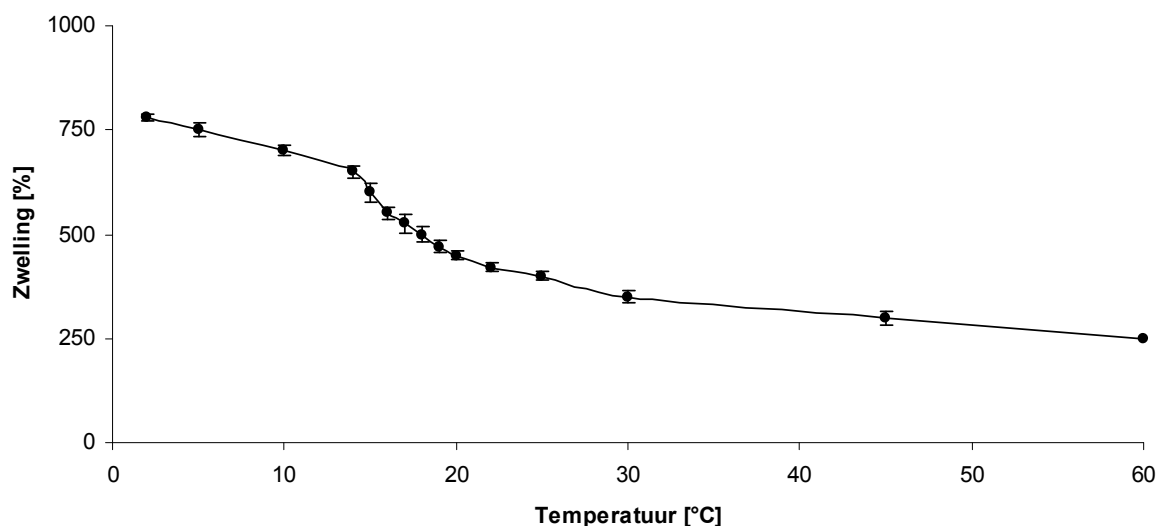
- R_i : de initiatiesnelheid
- k_p : de snelheidsconstante van de propagatie
- k_t : de snelheidsconstante van de terminatie
- $[M]$: de macromonomeerconcentratie

Naar het einde van de belichtingstijd buigt G' af naar een plateauwaarde, wat betekent dat de vernetting getermineerd is of dat de vernetting doorgaat met de maximaal bereikte opslagmodulus. Logischerwijs is de gelsterkte na curing ook evenredig aan de polymeerconcentratie van de precursoroplossing.

IV.2.5. Karakterisatie van de thermoresponsieve eigenschappen van een covalent vernette Pluronic® F127 BMA hydrogel.

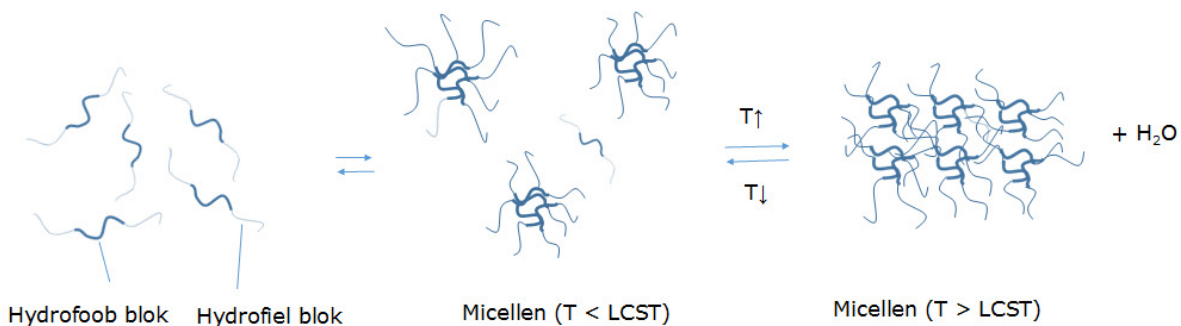
In deze paragraaf wordt nagegaan in welke mate de hydrogelen hun thermoresponsief karakter behouden na vernetting, dit is een belangrijk gegeven voor de zwellingskarakteristieken in de finale toepassing. Het thermoresponsieve gedrag van Pluronic® F127 is uitvoerig beschreven in het vorige hoofdstuk en wordt verklaard door het aggregeren van de hydrofobe PPO-blokken. De mate waarin deze aggregatie nog steeds plaats heeft na het chemisch vernetten van de hydrogelen wordt onderzocht door het bepalen van de zwellingsgraad in functie van de temperatuur (303).

Voor dit experiment worden vernette hydrogelen aangemaakt uitgaande van een 30% (g/g) oplossing van Pluronic® F127 BMA in aanwezigheid van 1.0 mol% Irgacure 2959 via 15 minuten irradiatie. Om neveneffecten bij het opstellen van de zwelisothermen te vermijden, worden de stalen uitgeloozd met water om de solfractie te verwijderen. Van deze uitgeloozde hydrogelen wordt de zwellingsgraad bij evenwicht bepaald in een dubbelwandig thermostatisch bad bij temperaturen variërend van 0 tot 60°C (zie Figuur IV.2.5). De weergegeven temperaturen zijn deze gemeten in het zwelmedium (cfr. water).



Figuur IV.2.5 - Thermoresponsief karakter van de vernette hydrogel op basis van Pluronic® F127 BMA (30% (g/g)) bepaald door middel van de zwellingsgraad bij evenwicht in functie van de temperatuur (n=3).

Door opwarmen van het incubatiemedium blijkt dat de gelen water uitstoten en aanleiding geven tot krimp. Dit wordt duidelijk gemaakt aan de hand van de datapunten bij 2°C en 60°C met elkaar te vergelijken. Hierbij daalt de evenwichtszwellingsgraad van $780\% \pm 10\%$ naar $250\% \pm 15\%$. Deze krimp gaat gepaard met een wateruitstoot waarvan de grootste bijdrage plaatsvindt tussen 14 en 19°C. Een zelfde trend wordt vastgesteld door Alexandridis et al (142) voor verschillende PEO-PPO-PEO blokcopolymeren. De geobserveerde krimp in functie van de temperatuur kan verklaard worden door de aggregatie van de PPO-blokken met vorming van hydrofobe domeinen (zie Figuur IV.2.6). Bij deze associatie wordt de mantel van gebonden water uitgestoten, waardoor de interactie tussen de hydrofobe domeinen en het oplosmiddel verlaagd wordt tot zijn minimale waarde. De PEO-blokken blijven gehydrateerd gedurende dit reversibel proces.



Figuur IV.2.6 - Schematische voorstelling van de geobserveerde krimp van de hydrogelen bij variatie van de temperatuur.

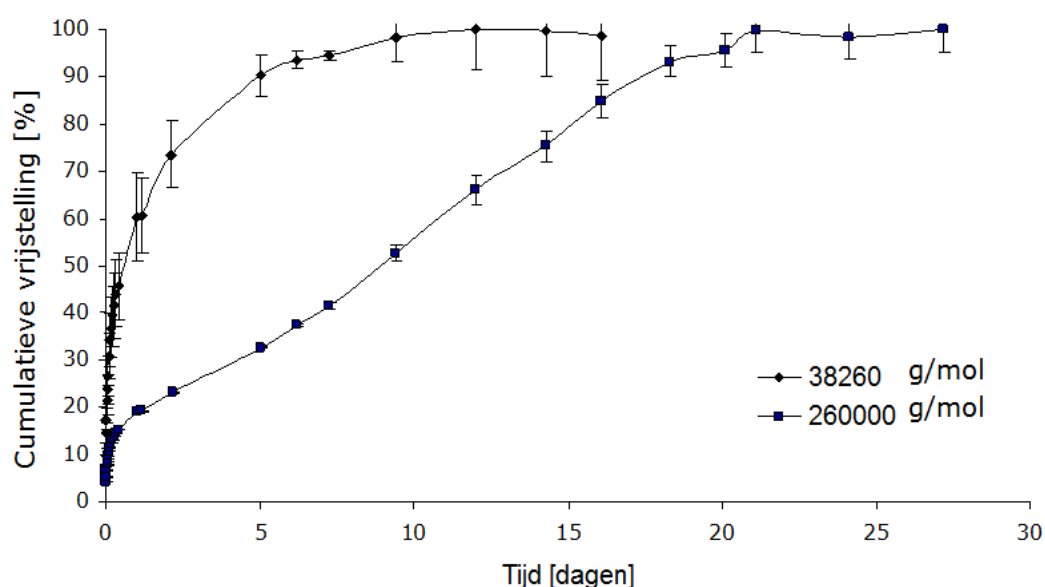
IV.2.6. Toepassing van Pluronic® F127 BMA gebaseerde hydrogelen als reservoir voor de vrijstelling van macromoleculen.

Zowel voor het gebruik als encapsulatiemateriaal als voor het gebruik in cultuur-reactoren voor transplantatietoepassingen zullen de massatransporteigenschappen van het encapsulatiemateriaal een belangrijk aandachtspunt vormen (18). Voor transplantatie dient het materiaal een snelle diffusie toe te laten van nutriënten en afvalstoffen, alsook voor ieder belangrijk metabolisch product. Tegelijkertijd dient het diffusie van moleculen en mogelijke mediators van immuunrespons te hinderen. Twee types macromoleculen worden gebruikt als model voor macromoleculaire geneesmiddelen waaronder dextraan (cfr. polysaccharide) en bovine serumalbumine (cfr. BSA, proteïne). Deze modellen worden gebruikt om de vrijstelling van groeifactoren, monoclonale antilichamen, DNA, enz... na te bootsen.

IV.2.6.1. Vrijstelling van FITC dextranen uit een Pluronic® F127 BMA hydrogel.

Dextraan is een hydrofiel polysaccharide bestaande uit 95% α -D-1-6 gelinkt anhydroglucose. De overblijvende bindingen bestaan uit 1, 3-verbindingen die aanleiding geven tot vertakkingen van de hoofdsuikerketen (274-275). Om de detectie van deze macromoleculen makkelijker te maken wordt gebruik gemaakt van fluoresceïne isothiocynaat (FITC) gemodificeerd dextraan (door deze modificatie neemt de hydrofobiciteit van het dextraan licht toe). Er worden twee moleculaire gewichten

gebruikt: 38.260 g/mol (FD40) en 260.000 g/mol (FD260). Deze producten worden gekarakteriseerd door hun Stokes radii van 45 en circa 120 Å respectievelijk. Deze fluorescerende producten hebben een maximale absorptie bij 490 nm en een maximale emissie bij 520 nm (304). Het laden van de hydrogelen met dextranen kan gebeuren via vermenging met de macromonomen voor vernetting. De dextraanconcentratie in de gellen bedraagt in alle gevallen 1% (g/g). De bekomen gellen worden geïncubeerd in fosfaatbuffer en het supernatans wordt tijdsafhankelijk geanalyseerd met behulp van fluorescentiespectroscopie. De cumulatieve vrijgestelde fractie wordt uitgezet in functie van de tijd. De vrijstelling van FD40 en FD260 uit een 30% (g/g) Pluronic® F127 BMA hydrogel in functie van de tijd wordt weergegeven in Figuur IV.2.7. Het dextraan FD40 vertoont een 'burst-release' diffusiepatroon, terwijl de vrijstelling van dextraan FD260 vertraagd verloopt. Het verschil in diffusie kan men verklaren door het gegeven dat kleinere moleculen mobieler zijn en zich makkelijker kunnen verplaatsen doorheen een hydrogelmatrix. Het 'burst-release' patroon van FITC dextraan is analoog met de bevindingen van Kang (305) voor Pluronic® F127.



Figuur IV.2.7 - Vrijstelling van FD40 en FD260 uit een 30% (g/g) Pluronic® F127 BMA hydrogel (n=3) bij 37°C bestudeerd door middel van fluorescentiespectroscopie.

Uit deze studie blijkt dat de hydrogelen gebruikt kunnen worden voor de afgifte van macromoleculen over een tijdsinterval van een 20 tal dagen gedurende een bepaald tijdsinterval.

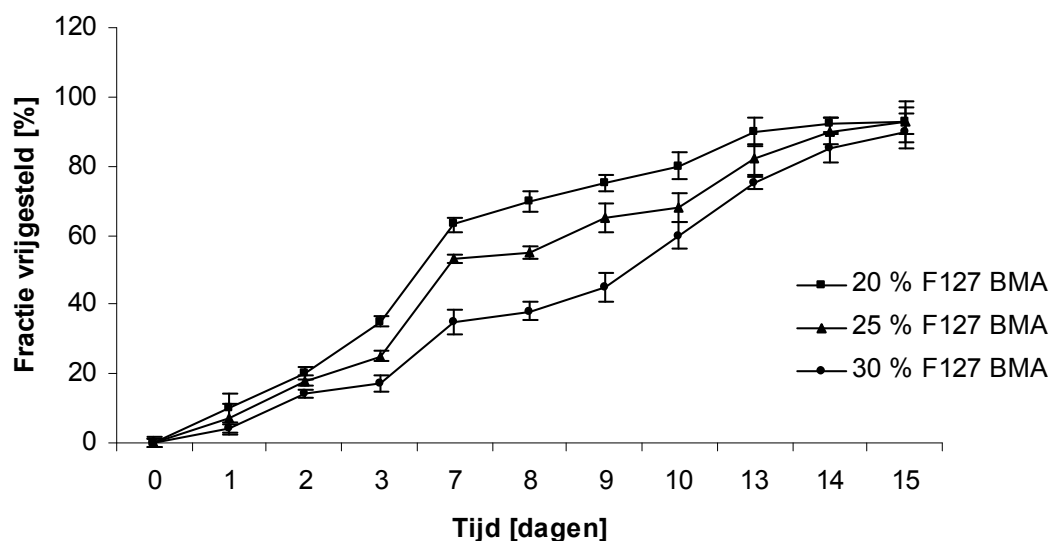
IV.2.6.2. Vrijstelling van bovine serum albumine uit een Pluronic® F127 BMA hydrogel.

Als modelproteïne voor de vrijstelling van proteïnen uit hydrogelmatrices wordt runderalbumine (BSA) geselecteerd. BSA is een globulair proteïne met een benaderend moleculair gewicht van 66000 Da en een hydrodynamische diameter van 72 Ångström (306). De aminozuursamenstelling van dit eiwit wordt gekarakteriseerd door een grote fractie van de aminozuren cysteïne, asparaginezuur, glutaminezuur, lysine en arginine.

Het ladingspercentage BSA in de hydrogelen bedraagt in alle gevallen 0.1% (g/g), ongeacht de polymeerconcentratie. Na incubatie bij 37°C in fosfaatbuffer kan het supernatans bestudeerd worden naar zijn eiwitconcentratie. De concentratie van BSA wordt spectrofotometrisch bepaald met behulp van een quantitative kleuringsmethode die gebruikt wordt voor de bepaling van de totaalconcentratie van eiwitten. Deze test, ook wel de Bradford methode genoemd (307), wordt voornamelijk gebruikt voor de bepaling van het proteïnegehalte van celfragmenten of het evalueren van de proteïneconcentratie bij gel-elektroforese. Het is gebaseerd op de verschuiving van het absorptiemaximum van Coomassie blauw G-250 van 465 nm naar 595 nm indien de kleurstof bindt aan een proteïne. Volgens de gebruikte methode kan een BSA concentratie van 2.5 tot 25 µg/ml in fosfaatbuffer bepaald worden.

De invloed van de polymeerconcentratie in de hydrogelen op de vrijstellingskinetiek van BSA wordt geïllustreerd in Figuur IV.2.8. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van Pluronic® F127 BMA hydrogelen die bereid worden uitgaande van 20, 25 en 30% (g/g) concentraties. Er kan besloten worden dat een lagere polymeerconcentratie aanleiding geeft tot een snellere cumulatieve vrijstelling van BSA in functie van de incubatietijd. De

gemiddelde onderlinge waarden tussen twee en tien dagen zijn significant ($p < 0.05$) van elkaar verschillend voor de verschillende concentraties.



Figuur IV.2.8 - Invloed van de Pluronic® F127 BMA concentraties van de hydrogelen op de vrijstellingskinetiek van BSA ($n=3$) bij 37°C.

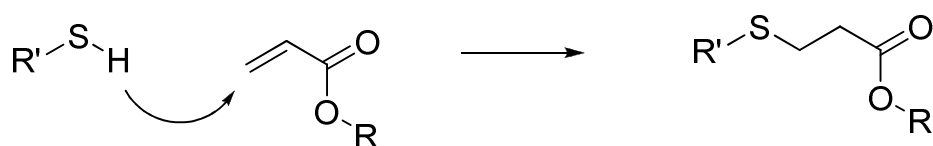
Men kan concluderen dat de Pluronic® F127 BMA hydrogelen geschikt zijn voor gecontroleerde afgifte van macromoleculaire geneesmiddelen, zoals aangetoond door Tal Eshel-Green et al (308) voor Pluronic® F127 BA, voor ethyeeldiamine vernet Pluronic® F127 door Rajesh et al (309) en door Kabanov (310) voor Pluronic® P85 blokcopolymeren. Het vrijstellingsmechanisme is afhankelijk van de hydrodynamische diameter van de drugs. Er wordt in functie van de tijd een gelijke concentratie van het geneesmiddel afgegeven door de verschillende Pluronic® F127 BMA hydrogelen.

IV.3. Vernetting van thiol-acrylaat gebaseerde Pluronic® F127 macromonomeren.

De reactieve centra die gegenereerd worden door een radicaal geïnitieerd vernettingsproces kunnen cytotoxisch zijn. In bepaalde toepassingen zoals cel, proteïne of DNA encapsulate, kunnen residuele initiator moleculen problematisch zijn (311-312). Het onschadelijke karakter van Michael-type additie reactie laat een milde vernetting toe.

Een Michaël type additie reactie refereert naar de additie van een nucleofiel naar een elektronenarme koolstof-koolstof dubbele binding (alkeen). Dit type reactie tussen thiolen en verschillende geactiveerde dubbele bindingen, zoals deze in acrylaten is veelvuldig toegepast in de bioconjugatie en biomaterialen door zijn milde condities en hoge rendementen. Eén van de eerste voorbeelden van thiol-acrylaat Michaël addities voor het vernetten van een hydrogel is gerapporteerd door Hubbell et al (62) waar PEG gefunctionaliseerd wordt met thiolen en acrylaatgroepen die vernet worden voor het encapsuleren en de gecontroleerde afgifte van albumine. Een aantal onderzoeken hebben zich toegespitst op thiol-acrylaat polymerisaties (313-314).

Indien een thiol-acrylaat gepolymeriseerd wordt, zal er competitie ontstaan tussen de 'chain-growth' homopolymerisatie van het acrylaat en het 'step-growth' mechanisme van de thiol-een polymerisatie. De dominantie van het propagatie mechanisme via een stapsgewijze of 'chain growth' polymerisatie heeft een drastisch effect op de netwerkstructuur en de uiteindelijke materiaaleigenschappen. Gezien de nucleofiele additie van het thiol aan een α,β -onverzadigde carbonyl-verbinding, kan gesproken worden van een Michaël-type additie (Figuur IV.3.1).



Figuur IV.3.1 - Michaël-type additiereactie van een thiol en een acrylaat.

Voor het bekomen van een chemisch vernet polymeernetwerk dienen meer dan twee functionele groepen geïncorporeerd te worden op het Pluronic[®] macromonomeer of op één van de reactiepartners. In deze paragraaf worden er twee benaderingsmethoden bestudeerd. Een eerste methode bestaat erin om de Pluronic[®] F127 bisthioacetaat te hydrolyseren naar het overeenkomstige Pluronic[®] F127 bisthiol. In een volgende stap gaat men na of we dit derivaat kunnen vernetten met een commercieel verkrijgbare acrylaat crosslinker. In een alternatieve methode wordt de mogelijkheid nagegaan om Pluronic[®] F127 bisacrylaat te vernetten met een commerciële thiol vernetter.

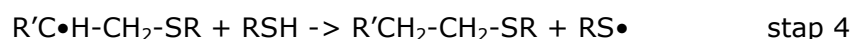
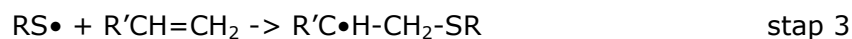
IV.3.1. Mechanisme van de thiol-een polymerisatiereactie.

De thiol-acrylaat reactie is de hydrothiolering van een C=C binding. Historisch gezien wordt in het domein van de polymeermaterialen de reactie het meest toegepast voor het bereiden van netwerken en filmen, zoals geïllustreerd in het werk van Hoyle et al (315-325) en Bowman et al (326-332). Thiol-acrylaat polymerisaties zijn reacties tussen een multifunctioneel thiol en een 'een' (cfr. vinyl) monomeer dat zal aangroeien volgens een stapsgewijs, radicalair additiemechanisme. Initiatie wordt bereikt door de generatie van een radicalair centrum en vindt meestal plaats via foto-initiatie. Posner (333) ontdekte als eerste het bestaan van de thiol-een additiereactie in 1905 en reactiemechanisme. Kharasch et al (334) stelden als eersten het thiol-een polymerisatiemechanisme voor in 1938 (Figuur IV.3.2).

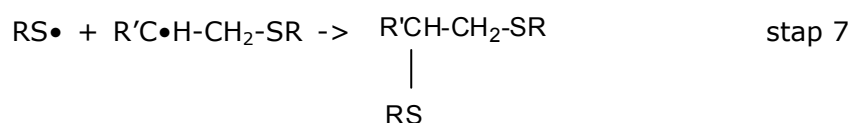
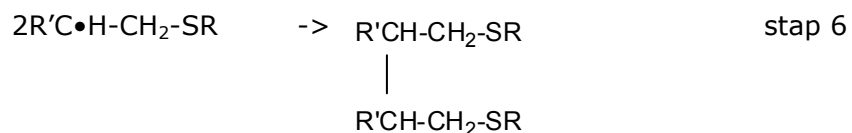
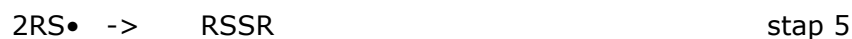
Initiatie



Propagatie



Terminatie



Figuur IV.3.2 – Reactieschema van het thiol-een reactiemechanisme.

Stap 1 en 2 zijn initiatiestappen. In stap 1 zal een foto-initiator geëxciteerd worden door de absorptie van een foton. Deze zal een waterstof onttrekken aan het thiol monomeer (stap 2), hetgeen een thiyl radicaal zal genereren dat kan propageren of termineren. Het sequentiële propagatie chain transfer mechanisme is een stapsgewijze polymerisatie, zoals weergegeven in stappen 3 en 4. Op basis van deze mechanismen wordt aangenomen dat, indien men stoichiometrische hoeveelheden neemt van de functionele groepen van het thiol en het 'een', deze componenten in gelijke mate geconsumeerd worden (335).

De initiatie- en de propagatiemechanismen van de thiol-een reacties worden goed begrepen, terwijl het terminatiemechanisme complexer is. Verschillende onderzoekers hebben reeds meerdere mechanismen en theorieën voorgesteld betreffende de terminatie en het belang ervan in thiol-een reacties (302, 304-305). Terminatie wordt verondersteld om door te gaan door radicaal-radicaal recombinitie (stap 5-7). Een niet weergegeven terminatie mechanisme, is dat van een radicalaire recombinitie met de initiële producten.

De aanwezigheid van zuurstof in thiol-een polymerisatiereacties leidt tot een additionele chain-transfer reactie, maar wordt niet beschouwd als betekenisvol aangezien deze de polymerisatiesnelheid niet drastisch kan wijzigen (334, 336-337). In geval zuurstof aanwezig is gedurende de polymerisatie, zal er een additionele ketentransfer reactie plaatsvinden tussen stap 3 en 4. Zuurstof kan geïncorporeerd worden in de groeiende polymeerketen als een peroxy radicaal dat een ketentransfer zal ondergaan. De foto-initiator kan efficiënt gereduceerd worden door de aanwezigheid van zuurstof via 'excited state quenching'. Dit aspect van thiol-een polymerisaties is in contrast met een zuivere acrylpolymerisatie waar de aanwezigheid van zuurstof sterk de polymerisatie kan inhiberen. Een opmerkelijk aspect van thiol-een polymerisaties is dat de reactie gemakkelijk doorgaat in afwezigheid van een initiator. Dit resulteert in een onstabiliteit van thiol-een systemen en verklaart waarom vele systemen een stabilisator bevatten (336, 338-339). Door gebruik te maken van ^1H -NMR spectroscopie bestudeerden Szmant

et al (337, 340-341) de thiol-een 'charge-transfer' interactie en toonden aan dat deze verantwoordelijk is voor de donkere initiatie van de reactie via zuurstof. Er bestaat tevens de hypothese dat de 'charge-transfer' interactie belangrijk is in de foto-geïnduceerde generatie van de radicalen in de aanwezigheid van een foto-initiator (342). Thiol-een koppelingsreacties vertonen veel karakteristieken van 'click' reacties en zijn een extreem makkelijke weg om twee moleculen te linken op een regio-selectieve manier. In recente jaren is het een waardevolle techniek geworden voor het uitvoeren van 'click' type reacties (343).

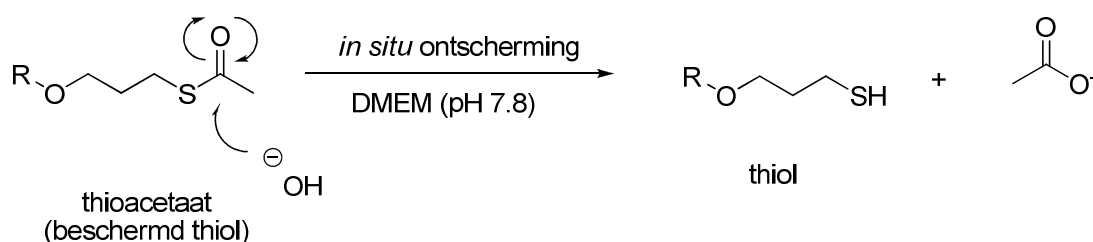
IV.3.2. Hydrogelen bekomen uit een Pluronic® F127 bisthiol met een acrylaat vernetter.

IV.3.2.1. Het ontschermen van Pluronic® F127 bisthioacetaat onder fysiologische omstandigheden.

Met het oog op celencapsulatie doeleinden kunnen vrije thiolfuncties van een Pluronic® F127 bisthiol een hindernis zijn. Deze groepen kunnen tijdens het bewaren dimerizeren op een ongecontroleerde manier. Om dit te voorkomen hebben we in het huidige werk een *in situ* ontschermingsmechanisme toegepast. De terminale hydroxylgroepen van de Pluronic® F127 worden omgezet naar thioacetaat esters. In basisch midden zullen deze omgezet worden in het overeenstemmende thiol als de donor in de Michaël-type additiereactie (344). Een aantal reactieve thiolgroepen kunnen gebruikt worden voor het ontwerp van de andere reactiepartner in de additiereactie, zoals vinylsulfonen (345) en acrylaatesters (346). Het thiol-vinyl sulfon resulteert in een hydrolytisch stabiele link. In dit werk hebben we gekozen om te focuseren op acrylaten als reactiepartner, zodat er ester bevattende en hydrolytisch degradeerbare gelen gevormd worden (347). De commerciële acrylaatvernetter is in dit geval de Michaël acceptor en het Pluronic® F127 bisthiol de Michaël donor. We richten ons in de eerste plaats op de deprotectie van de Pluronic® F127 bisthioacetaat.

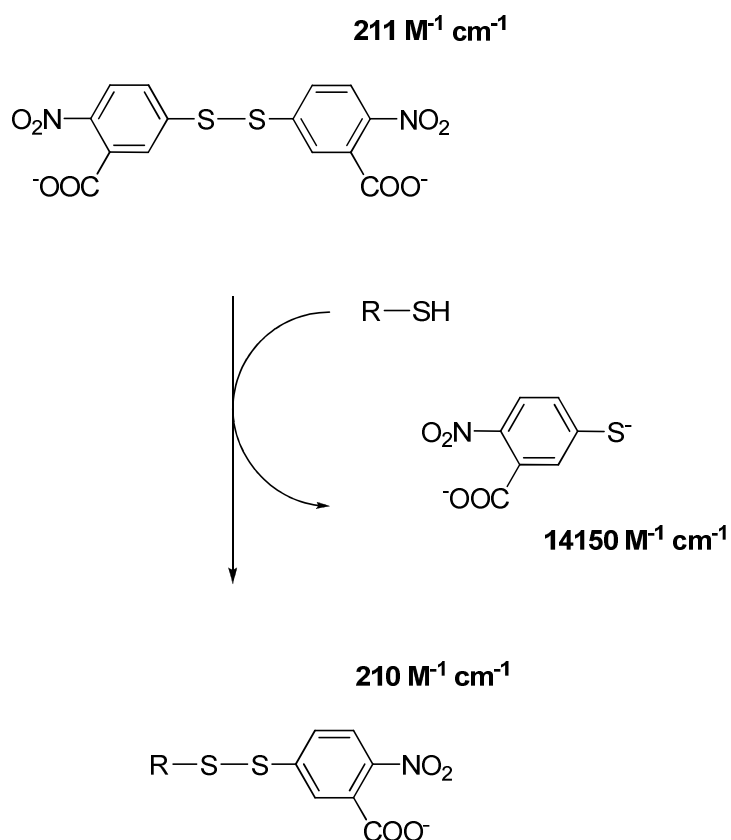
De sleutelvereisten voor thioacetaat gebaseerde éénpotreacties zijn: (1) De kinetiek van de deprotectie dient snel te verlopen om de vorming van disulfidebindingen tegen te

De deprotectie van de thiolfuncties wordt uitgevoerd bij pH 7,8. Dit stemt overeen met de zuurtegraad van het cultuurmedium DMEM. Het aantal vrije thiolen wordt bepaald via Ellmann's methode in functie van de tijd. Het deprotectiemechanisme is weergegeven in Figuur IV.3.3.



De kwantificatie van thiolen in oplossing wordt uitgevoerd met de methode van Ellman (348) met behulp van Ellman's reagens (i.e. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB). Thiolen reageren met deze component en zullen de disulfidebinding splitsen, wat aanleiding geeft tot het 2-nitro-5-thiobenzoaat (NTB^-). NTB^- zal ioniseren naar het NTB^{2-} .

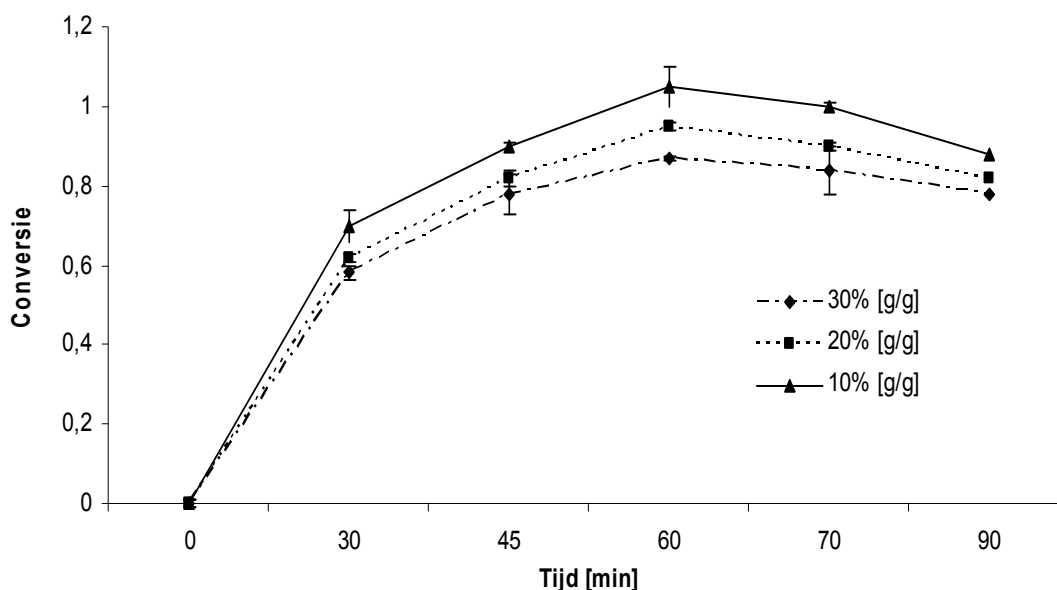
dianion in water bij neutrale en alkalische pH. De reactie is snel en stoichiometrisch en kan waargenomen worden door zijn gele kleur. De additie van één mol van een thiol geeft aanleiding tot het ontstaan van één mol NTB⁻. Het NTB²⁻ wordt gekwantificeerd in een UV spectrofotometer door de absorbantie van zichtbaar licht bij 412 nm te meten. De extinctiecoëfficiënt van een verdunde bufferoplossing is 14,150 M⁻¹ cm⁻¹. Zoals weergegeven in Figuur IV.3.4, gaat de reactie door tussen het thiolaat anion (R-S⁻) en het Ellman's reagens (DTNB²⁻). De molaire extinctiecoëfficiënt (ϵ_{412}) gelden bij een pH > 7.29.



Figuur IV.3.4 - Reactie van DTNB met een thiol.

In Figuur IV.3.5 is een kinetische studie van de thioldeprotectie bij verschillende polymeerconcentraties in een 0.2M NaOH oplossing weergegeven. De conversie (i.e. gedeprotecteerd thiol/totale thiolconcentratie) wordt berekend door het bepalen van de concentratie aan thiolgroepen met behulp van de Ellman's methode (349). De

oplossingen van Pluronic® F127 BTA worden volledig gedeprotecteerd na 60 min. Men kan stellen dat er een significant ($p < 0.05$) verschil is in de gemiddelden voor de verschillende concentraties na 30 minuten. Een maximale ontscherming wordt bekomen na 60 minuten. Nadien krijgen we een afname in de conversie, te wijten aan het vormen van disulfidebindingen.



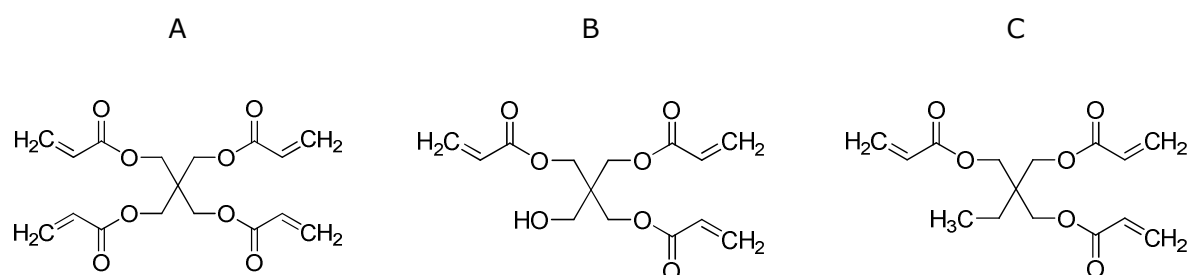
Figuur IV.3.5 - Conversie van de thioactetaatfuncties naar vrije thiolen in functie van de tijd voor verschillende Pluronic® F127 BTA concentraties ($n=3$).

De SH groep is een natuurlijk voorkomende functionaliteit op de zijketen van het aminozuur cysteïne in proteïnen en peptiden (350). De SH groep vormt disulfide bindingen (S-S) die essentieel zijn voor tertiaire proteïne structuren (351-352). Deze natuurlijke biochemische reacties geeft aanleiding voor de ontwikkeling van thiol gebaseerde conjugatiemethoden die gebruik maken van de goede nucleofiliciteit van het zwavelatoom ten opzichte van elektronenarme structuren zoals onder andere een α , β onverzadigde component zoals beschreven door Stenzel (353). Bij een fysiologische pH zal de nucleofiliciteit van een thiol veel sterker zijn dan een aminegroep, waardoor thiolen kunnen reageren met elektrofielen met een hogere selectiviteit. Daardoor is de thiolgroep een aantrekkelijke functionaliteit die gebruikt wordt in de chemische

modificatie van biopolymeren (353). Het vormen van disulfide vernette hydrogel nanodeeltjes wordt gemeld door Zhang et al (354). De milde vernettingsomstandigheden in de oxidatieve omgeving zorgt ervoor dat er bioactieve moleculen kunnen geïncorporeerd kunnen worden voor het encapsuleren van cellen en geneesmiddelen.

IV.3.2.2. Vernettingsstrategie voor een Pluronic® F127 bisthiol met een acrylaat vernetter.

Verschillende vernettingsmogelijkheden met commerciële acrylaatvernetters, opgenomen in Figuur IV.3.6, worden aangewend. De oplossing wordt tussen twee glasplaten gebracht gescheiden door een siliconenspacer en vervolgens blootgesteld aan UV licht (golflengte: 365 nm, I: 5 mW/cm², dubbelzijdig).



Figuur IV.3.6 – Chemische structuur van commerciële acrylaatvernetters: (A) Pentaerythritol tetraacrylaat, (B) Pentaerythritol triacrylaat, (C) Trimethylolpropan triacrylaat.

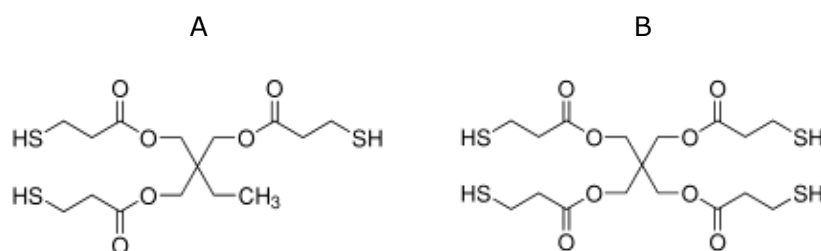
De bepaling van de optimale mengcondities wordt uitgevoerd met een geïsoleerd en opgezuiverd Pluronic® F127 bisthiol om vervolgens toe te passen als een éénpotreactie. Lange reactietijden zullen de vorming van disulfidebindingen bevorderen. Door het pH afhankelijk karakter van een Michael-type additie, zal de keuze van een geschikte pH (7.2) primordiaal zijn voor het bekomen van de gewenste viscositeit in een optimaal tijds kader (\approx 1h). Om een optimale pH te bekomen voor de mengfase dient men de basische bisthiol oplossing (pH \approx 12,5) te neutraliseren. De neutralisatie dient plaats te vinden vooraleer men een acrylaatvernetter kan toevoegen. De pH van de bisthiol

oplossing wordt verlaagd naar 7.2 door het toevoegen van een 0.2 M HCl oplossing en vervolgens aangepast tot de gewenste waarde door het toevoegen van een kleine hoeveelheid azijnzuur. Deze tweede toevoeging van een zwak zuur laat een fijne pH regeling toe, zonder lokale aanzuring en ester hydrolyse.

De geoptimaliseerde verwerkingscondities zoals hierboven beschreven worden toegepast voor de bereiding van gellen in een tandemproces. Echter treedt er geen vernetting op voor geen enkele commerciële acrylaatvernetter zoals beschreven staat voor verschillende soorten Tetronics[®] door Cellesi et al (182).

IV.3.3. Hydrogelen bekomen uit een Pluronic[®] F127 bisacrylaat met commerciële thiol vernetter.

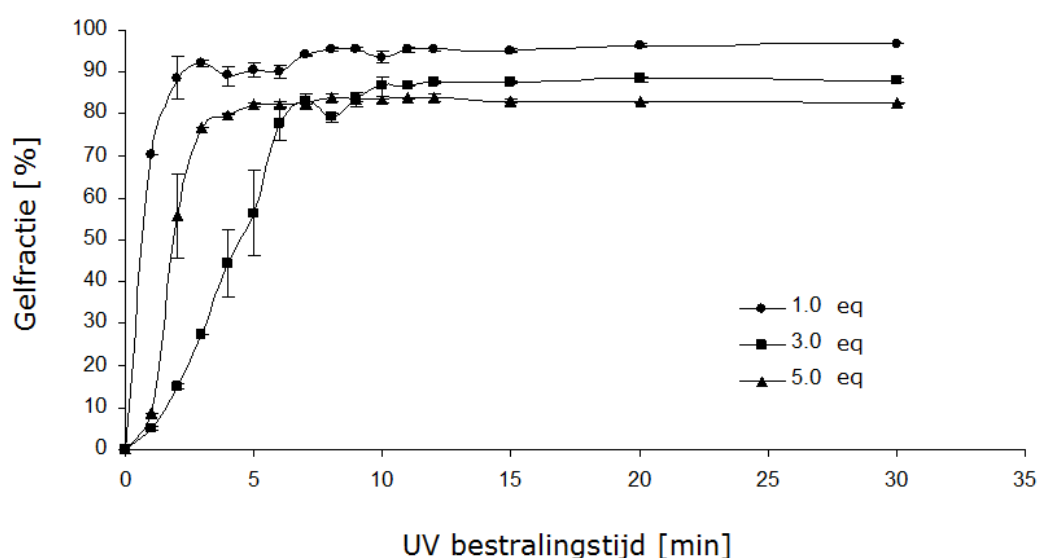
Pluronic[®] F127 BA wordt opgelost in water (30% (g/g)), waarbij er telkens verschillende hoeveelheden tetrathiol worden toegevoegd. In Figuur IV.3.7 zijn 2 commerciële thiolvernetters opgenomen, (A) trimethylolpropane tris(3-mercaptopropionate) en (B) pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate). In volgende paragrafen maakt men gebruik van het tetrathiol (B).



Figuur IV.3.7 – Chemische structuur van commerciële thiol vernetters: (A) trimethylolpropan tris(3-mercaptopropanoaat) en (B) pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropanoaat).

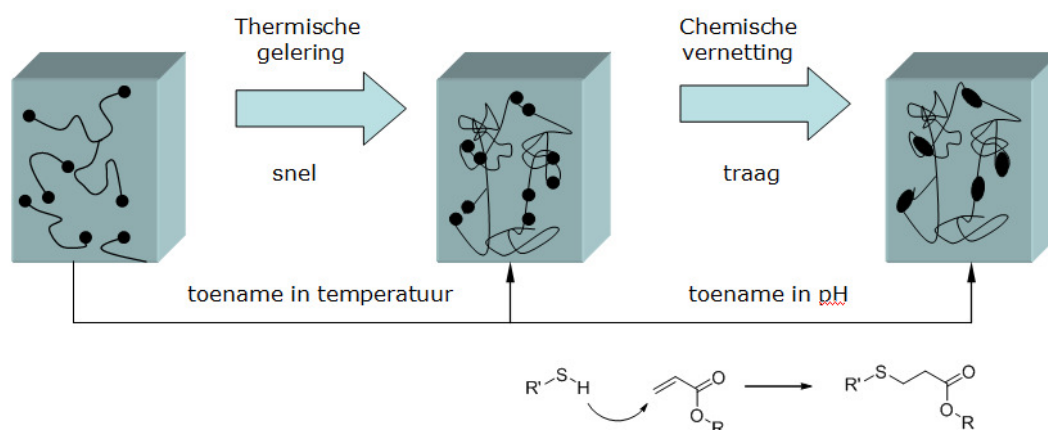
Door de incompatibiliteit van deze componenten, wordt de samengestelde fasen geëmulsiëerd. De oplossing wordt tussen twee glasplaten gebracht, gescheiden door een siliconenspacer en vervolgens blootgesteld aan UV licht (golflengte: 365 nm, I: 5

mW/cm², dubbelzijdig). Op regelmatige tijdstippen wordt er een staaltje geponsd (Ø6 mm) en worden hun sol/gel gelfracties bepaald. Uit Figuur IV.3.8 kan geconcludeerd worden dat er een evenwichtssituatie bereikt wordt na 10 minuten UV bestraling. Men kan stellen dat er een significant ($p < 0.05$) verschil is in de finale gelfractie voor verschillende equivalenten vernetter. Het conversieprofiel van de initiatorvrije fotopolymerisatie stemt overeen met deze bekomen voor een PEG-PLA diacrylaat door E. Rydholm et al (355). Snelle fotopolymerisatiereacties in de afwezigheid van foto-initiatoren is waargenomen voor verscheidene thiol-acrylaat en thiol-een systemen (295, 320-323). Een bijkomende voordeel van initiatorvrije polymerizaties is de mogelijkheid om dikkere gellen te vernetten dan netwerken die foto-initiator bevatten. Dit is te wijten aan de verzwakking van het licht dieper in het staal. Initiatorvrije thiol-acrylaat systemen met een diepte tot meer dan 10 cm zijn beschreven door Cramer et al (356). Polymerisatie zal sneller gaan op de top van het staal, daar waar de lichtintensiteit de grootste is. Vervolgens zal een verdere blootstelling leiden tot een volledige polymerisatie van het staal.



Figuur IV.3.8 - Gelfractie in functie van de UV bestralingstijd (5 mW/cm², $\lambda = 365$ nm) voor emulsies van Pluronic® F127 BA in aanwezigheid van verschillende equivalenten pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropanoaat) ($n=3$).

Het geleringsproces bestaat zowel uit een fysisch als chemisch mechanisme, dit noemt men een tandem proces. Hierbij zal eerst het thermoresponsieve Pluronic® F127 BA geleren en vervolgens vernet worden door de reactie van de eindgroepen van het polymeer. Een schematische voorstelling van dit tandem proces is weergegeven in Figuur IV.3.9 en is een ideaal systeem is voor celencapsulatie doeleinden.



Figuur IV.3.9 – Overzicht van het tandem geleringsmechanisme voor een Pluronic® F127 BA hydrogel.

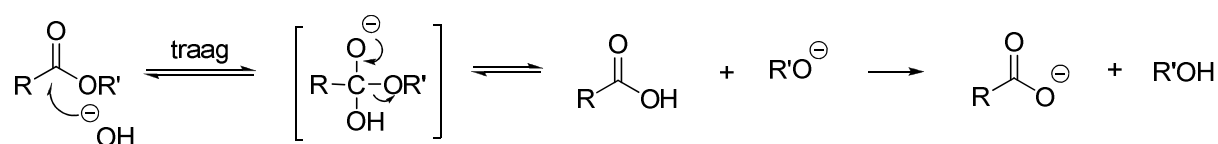
De Michaël-additie reactie wordt gekatakyseerd in een licht basisch milieu, waardoor het overbodig is een radicaalinitiator toe te voegen. De snelle kinetiek van de omkeerbare thermische gatering en het onschadelijke karakter van de Michaël-type tussen het acrylaat en de thiol groep resulteren in een onomkeerbare vernette hydrogel. Francesco Cellesi et al (209) toonde aan dat het 'tandem' proces (voor PEG en Pluronic®) kan gebeuren in een direct contact met cellen.

IV.3.4. Zwelling en degradatie van Michaël-type vernette Pluronic® F127 hydrogelen.

Voor de meeste weefselregeneratie- en 'drug delivery' toepassingen, zullen biomaterialen met een gecontroleerd degradatiegedrag wenselijk zijn. Metters et al (357) toonden de impact aan van monomeer en solvent concentraties in de netwerkstructuur op het degradatiegedrag voor de additiepolymerisatie van PEG-PLA-diacrylaat monomeren. In condensatiegelen gevormd door thiol-acrylaat Michaël-additiereacties, observeerde Elbert

et al (347) een toenemend zwellingsgedrag en toenemende hydrolytische degradatiesnelheden met stijgende monomeerfunctionaliteit en solventconcentratie.

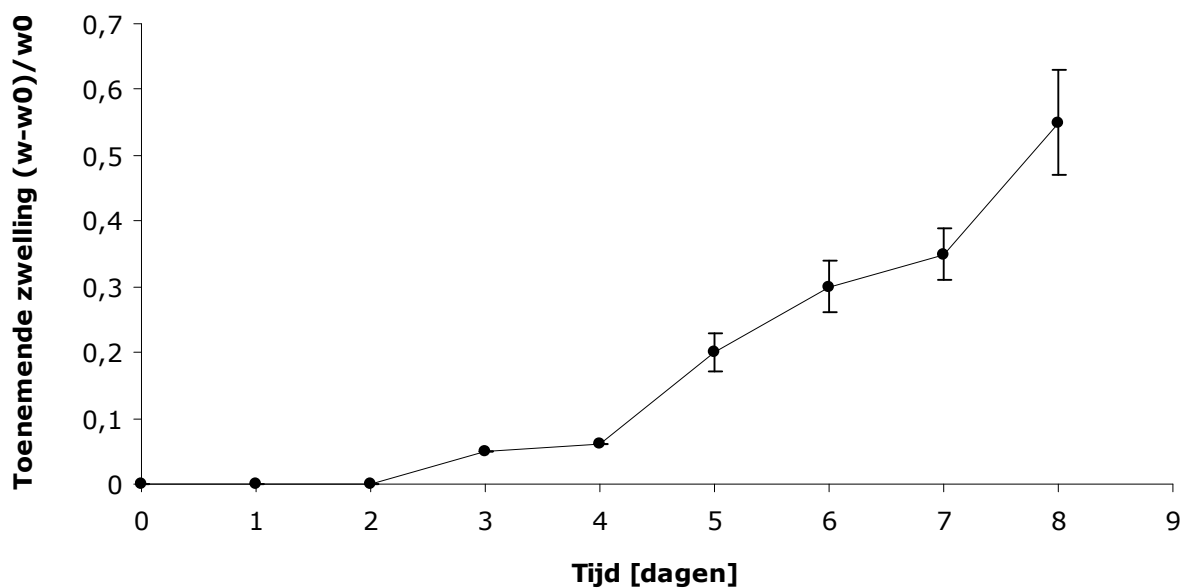
Degradatie van de netwerkstructuur kan zowel enzymatisch als hydrolytisch doorgaan. De aanwezigheid van een ester bevattende reactiepartner maakt de hydrogel gevoelig voor hydrolytische degradatie. Door de hydrogelen te incuberen onder fysiologische omstandigheden kan er enkel chemische hydrolyse optreden in functie van de tijd. De mate van hydrolytische degradatie wordt gevolgd door het meten van de zwelling bij toenemende incubatietijd. Het mechanisme van de basische hydrolyse is weergegeven in Figuur IV.3.10.



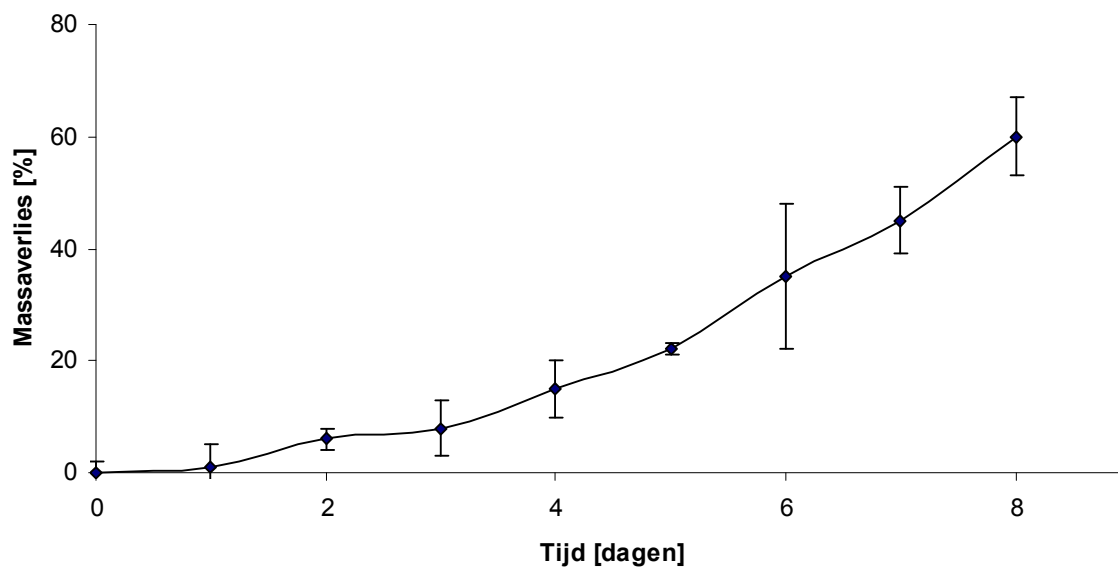
Figuur IV.3.10 - Additie-eliminatie mechanisme van de basische hydrolyse.

De hydrolyse kan doorgaan in zowel alkalisch als zuur gekatalyseerde omstandigheden. De enzymatische hydrolyse wordt veroorzaakt door esterases via het breken van de esters (358-360). In de meest ideale situatie dient de snelheid van degradatie het spiegelbeeld te zijn van de snelheid waarmee nieuw weefsel gevormd wordt.

De zwellingsgraad van de hydrogelen kan in relatie gebracht worden met de vernettingsdichtheid. Door hydrolyse worden er bindingen doorbroken die zich tussen de netwerkknooppunten bevinden waardoor de gemiddelde knooppuntafstand stijgt. Dit resulteert in een verhoogde opname van water bij evenwichtszwelling. Onder invloed van de degradatie van de hydrogelmatrix wordt de diffusieconstante beïnvloed. Deze eigenschap speelt een belangrijke rol bij gecontroleerde geneesmiddelaafgifte systemen doordat ze het vrijstellingspatroon mee bepalen. Het evenwicht wordt bereikt na drie dagen incubatie. Het effect van degradatie wordt pas duidelijk na de derde dag, gezien de toename in zwelling tot 80% na 10 dagen. Nadien worden verdere metingen door een gebrek aan mechanische sterkte onmogelijk (Figuur IV.3.11).



Figuur IV.3.11 - Toenemende zwelling in functie van de tijd voor polymeernetwerken van Pluronic® F127 hydrogelen (bekomen uit bisacrylaat met een tetrathiol) (30% (g/g)) gelen geïncubeerd in PBS (10 mM, pH = 7.4). Met w het gemiddelde gewicht van het staal (n=3).



Figuur IV.3.12- Massaverlies in functie van de tijd voor polymeernetwerken van Pluronic® F127 hydrogelen (bekomen uit bisacrylaat met een tetrathiol) (30% (g/g)) gelen geïncubeerd in PBS (10 mM, pH = 7.4) (n=3).

In Figuur IV.3.12 wordt het massaverlies bij incubatie weergegeven. Na 9 dagen is het moeilijk om de waarde te bepalen, doordat de hydrogelen fragmenteren. Deze degraderen traag in functie van de tijd door de graduele splitsing van esterbindingen.

Zoals verklaard door Metters et al (357) is massaverlies gecorreleerd aan de snelheid waarmee de vernettingen zullen hydrolyseren en het aantal vernettingen dat dient te degraderen. Een ketenfragment van de triblok kan vervolgens vrijgesteld worden uit het netwerk. Het zwelgedrag hangt af van de vernettingsdichtheid van het netwerk (361). Evenwichtszwelling is omgekeerd afhankelijk van de vernettingsdichtheid; zodra degradatie verder gaat en de esterbinding hydrolyseert, zal de vernettingsdichtheid afnemen, met als gevolg dat de evenwichtszwelling zal toenemen. Als degradatie verder gaat tot het punt waar de kinetische ketens niet langer vastgebonden zijn aan het netwerk, zal de zwelling drastisch toenemen (361).

Wanneer het splitsen van vernettingspunten is doorgegaan tot het punt waarbij een significant aantal kinetische ketens niet langer vasthangen aan het polymeernetwerk, zal dit fenomeen bijdragen aan het massaverliesprofiel. Netwerken met kortere kinetische ketens hebben meer vernettingspunten die moeten degraderen vooraleer er massaverlies zal optreden. Degradatie wordt geïntroduceerd in covalent vernette netwerken door de inclusie van een hydrolytisch splitsbaar anhydride of ester (178, 325-327) groepen of enzymatisch splitsbare peptide bindingen (362-364) in de vernette segmenten.

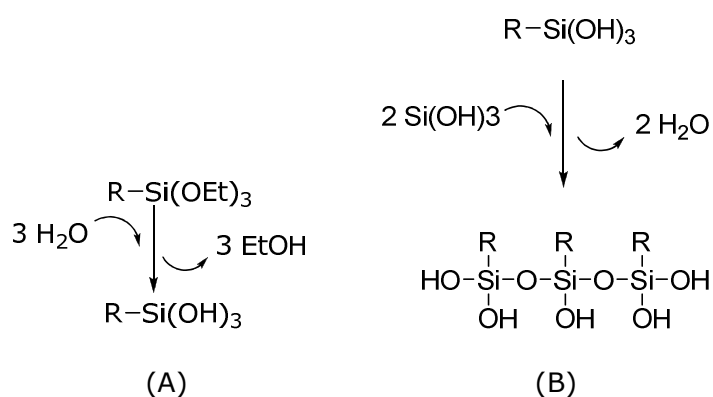
IV.4. Vernetting van ethoxysilaan gebaseerde Pluronic® F127 macromonomeren.

Silaancomponenten worden gekarakteriseerd door de structuur $(R'O)_3-Si-R$ waarbij R' een alkyl groep is en R een organofunctionele groep. De alkoxygroepen hydrolyseren in waterige omgeving, wat een condensatiereactie toelaat met de hydroxylfuncties en andere gehydrolyseerde silaanmoleculen. Het feit dat covalente bindingen tussen de hydrogel en het substraat kunnen gevormd worden, is een voordeel ten opzichte van de methacrylaat gebaseerde hydrogelen. Deze vormen wel polymeernetwerken, maar binden zich niet covalent aan substraten. De siloxaan gebaseerde hydrogelen binden zich bij polymerisatie wel op een eventueel aanwezig substraat (dat hydroxylfuncties bevat), waardoor een goede hechting tussen substraat en polymeer kan bekomen worden.

Het proces waarbij inorganische netwerken gevormd worden door silicoon precursoren omvat typisch twee reactiestappen (330-332). De eerste reactie omvat de hydrolyse van de alkoxidegroep voor het genereren van de silanol groep, gevolgd door een condensatiereactie van de silanolgroepen voor het produceren van siloxaanbindingen. De bijproducten zijn water of een alcohol.

Het fundamentele nadeel van de meeste anorganische-organische telechelische polymeren is dat de sol-gel reactie dient uitgevoerd te worden bij verhoogde temperatuur en in de aanwezigheid van sterke zuren (333-335).

De ethoxysilaan functies ondergaan een zuur gekatalyseerde hydrolyse (door toevoeging van een zuur zoals HCl of CH₃COOH) en creëren silanol groepen (Figuur IV.4.1 (A)). De reactieve silanolgroepen kunnen vervolgens oligomeren en polymeren vormen via een polycondensatiereactie bij verhoogde temperatuur Figuur IV.4.1 (B)).



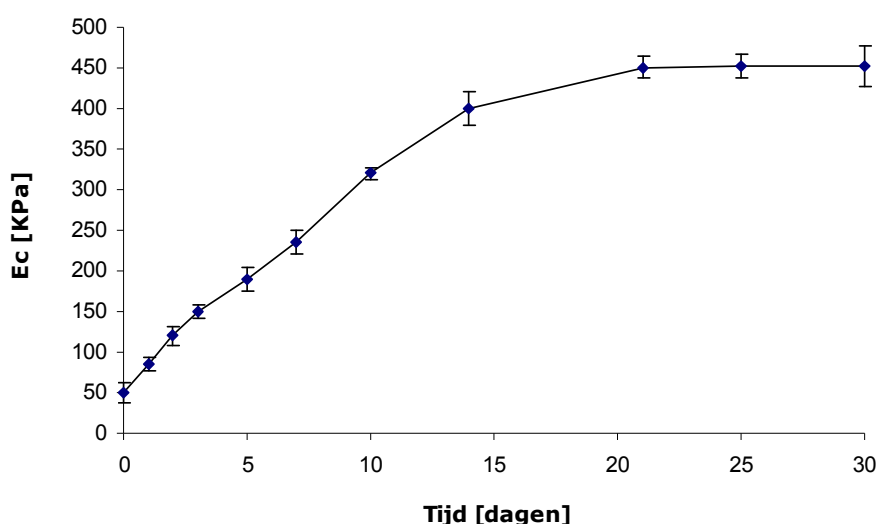
Figuur IV.4.1 - (A) Hydrolyse van een triethoxysilaan naar een triolsiloxaan en (B) polycondensatiereactie tussen de reactieve silanolgroepen met R = Pluronic® F127.

Bij verhoging van de temperatuur zal het water verdreven worden en verschuift het reactie-evenwicht naar rechts. Een stevig, chemisch vernet hydrogelnetwerk zal gevormd worden. De siloxaan gebaseerde hydrogelen binden bij polymerisatie op een aanwezig substraat dat hydroxylfuncties bevat, waardoor een goede hechting tussen het substraat en het polymeer kan bekomen worden.

'Silane coupling agents' hebben de eigenschap duurzame verbindingen te vormen tussen organische en anorganische materialen. Dit komt omdat er twee types van reactiviteit

(anorganisch en organisch) bevat zitten in één molecule. Het 'silane coupling agent' zal zich gedragen als een interface tussen een anorganisch substraat (zoals glas, metaal, minerale stoffen) en een organisch materiaal (zoals een organisch polymeer of coating) en zal zo de twee verschillende materialen koppelen.

Het tijdsafhankelijke mechanische gedrag van de gelen wordt weergegeven in Figuur IV.4.2, waarbij de compressiemodulus E_c in functie van de tijd wordt uitgezet. In deze figuur bemerken we een stijging van de compressiemodulus met een toename in tijd. Dit kan men toeschrijven aan het polymeriseren van de Pluronic® F127 di-IPTS doorheen de tijd. Een maximum wordt bereikt na 21 dagen.



Figuur IV.4.2 - De compressiemodulus (E_c) in functie van de tijd van een 20% (g/g) Pluronic® F127 di-IPTS bij 37°C (n=3).

Voor verschillende concentraties aan Pluronic® F127 di-IPTS wordt de gelfractie bepaald (Tabel IV.4.1). De hoogste gelfracties worden bekomen voor een 10 en 15% (g/g) aan Pluronic® F127 di-IPTS en zijn significant ($p < 0.05$) verschillend van de hogere concentraties. De geclusterde reactieve zijde is geassocieerd met sterische hinder: eens er reactie van een eerste functionele groep is doorgegaan, zal de reactiekinetiek van de tweede bij het ketenuiteinde sterisch vertraagd worden.

Tabel IV.4.1 - Overzicht van de bekomen gelfracties voor verschillende concentraties aan Pluronic® F127 di-IPTS (n=3).

Pluronic® F127 di-IPTS	
Concentratie [% (g/g)]	Gelfractie [%]
10	95 ± 1.7
15	94 ± 2.9
20	83 ± 1.7
25	86 ± 1.5
30	83 ± 1.4

Ronde staaltjes (Ø10 x 1 mm) worden uitgesneden uit vernette hydrogelen en vervolgens gedroogd tot een constant gewicht wordt bekomen. Vervolgens worden deze in gedeïoniseerd water geïncubeerd bij verschillende temperaturen voor verschillende tijdsperioden. In Tabel IV.4.2 zijn de zwellingsgegevens van vernet Pluronic® F127 di-IPTS bij 25 en 37°C opgenomen.

Tabel IV.4.2 - Zwellingspercentages bij 25 en 37°C op verschillende tijdstippen (1 uur – 7 dagen) voor Pluronic® F127 di-IPTS 30% (g/g) (n=3).

Zwellingspercentage [%]		
Immersietijd	25°C	37°C
1 uur	68 ± 0.2	45 ± 0.8
3 uur	78 ± 1.6	55 ± 1.7
6 uur	80 ± 0.8	60 ± 1.2
2 dagen	86 ± 0.2	66 ± 0.9
7 dagen	90 ± 1.4	62 ± 1.3

Zoals verwacht, zal de aanwezigheid van triethoxysilaaneindgroepen een effect hebben op het gedrag van de gefunctionaliseerde triblokken. Zo zal de minimum concentratie

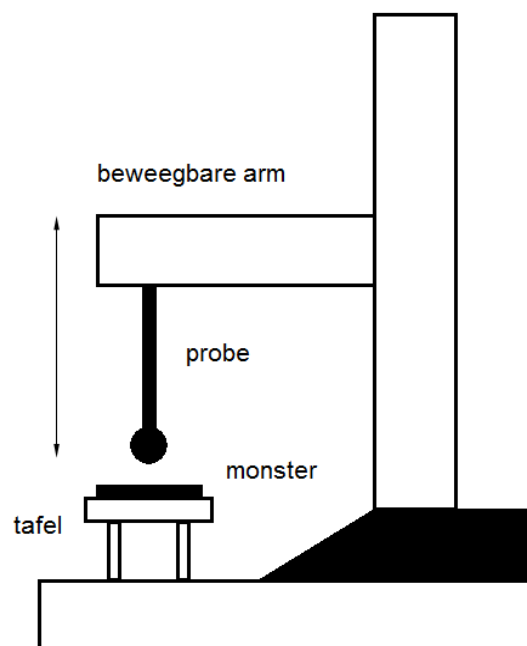
voor de detectie van een reversibele thermoresponsief gedrag gaan van 14.6% (g/g) voor Pluronic® F127 naar 15.0% (g/g) in het geval van Pluronic® F127 di-IPTS. Deze bevindingen kunnen toegeschreven worden aan de hydrofobe triethoxysilaan functies die aanwezig zijn aan beide zijden van de PEO-keten. Gelijkaardige resultaten worden bekomen voor Pluronic® F127 gemodificeerd met korte lactide of ϵ -caprolacton oligomere blokken (203).

In overeenstemming met zijn thermoresponsief gedrag, vertonen vernette hydrogelen een significante ($p < 0.05$) daling in zwellingspercentage bij 37°C. Het is duidelijk dat vernet Pluronic® F127 di-IPTS zijn potentieel behoudt om te zwellen en dit bij verschillende temperaturen en gepaard gaande met een verlies aan water bij verhoogde temperatuur. Dit fenomeen kan toegeschreven worden aan een moleculaire reorganisatie tussen de vernette bindingen en aan de gewonnen entropie te wijten aan het vrijstellen van de watermoleculen uit de hydrofobe segmenten.

IV.5. Karakterisatie van de mechanische eigenschappen van Pluronic® F127 hydrogelen via texturometrie.

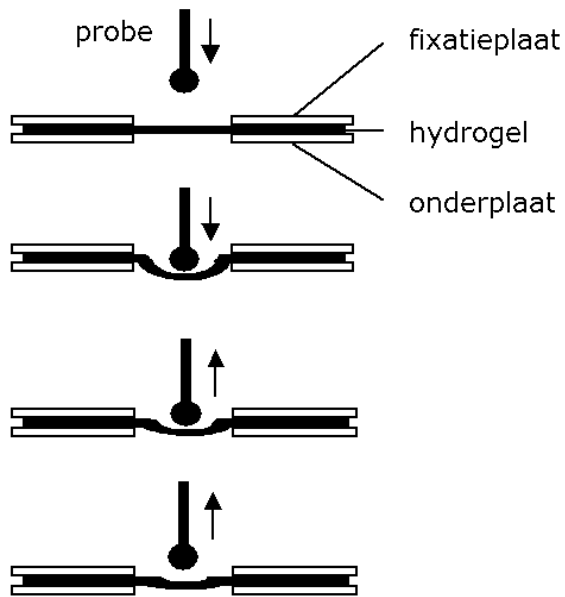
Verscheidende hydrogelen worden mechanisch geanalyseerd door gebruik te maken van een texturometer (zie Figuur IV.5.1). Hiermee is het mogelijk om op een eenvoudige en snelle manier een aantal hydrogeleigenschappen te bepalen (336-338). Instrumentele textuuranalyse werd ongeveer 40 jaar geleden ontwikkeld en is een hedendaags wijdverspreide techniek voor de karakterisatie van vaste en semi-vaste materialen. De mechanische belasting van een hydrogel kan leiden tot irreversible vervorming of breuk. Daardoor wordt een karakterisatie van de texturometrische eigenschappen van een hydrogel noodzakelijk. Met behulp van een plunjer of probe (cilindervormig, bolvormig, naaldvormig,) die met een bepaalde snelheid het monster perforereert of indrukt, wordt op het testmateriaal een compressiekracht aangebracht. Elasticiteit is de mate waarin een vervormd materiaal zijn oorspronkelijke toestand herwint na het verwijderen van zijn vervormende kracht. Een compressietest met balprobe is nuttig voor het meten van deze eigenschap. De sferische probe is een standaard gereedschap dat wordt gebruikt voor

het karakteriseren van zachte stalen, waarbij oneffenheden meer uitgevlakt worden. Men krijgt een licht vertekend beeld van de kracht/oppervlak curve doordat het contactoppervlak stijgt indien de bol dieper in het staal dringt. In veel gevallen waar de hardheid/zachtheid getest wordt, is de balprobe aangewezen in termen van zowel reproduceerbaarheid als resolutie. Het principe van een balprobe is dat de uniforme compressiekracht wordt verdeeld onder een normale hoek met het oppervlak van de bal. Dit geeft een gemiddeld effect op het te testen lokale gebied (365).



Figuur IV.5.1 – Schematische voorstelling van een texturometer (366).

Bij de proefopstelling van de texturometrische testen op 1 mm dikke hydrogelfilmen wordt geopteerd om te werken met een vlakke tafel met ronde uitsnijding. De hydrogelfilmen worden aangebracht over de opening. Door middel van een bovenliggende plaat met gecentreerde ronde uitsnijding wordt de hydrogel gefixeerd. Een probe (12 mm in diameter) wordt in het staal gedrukt met een snelheid van 0.1 mm/min bij 37°C (Figuur IV.5.2). De gemeten kracht en de penetratiediepte (0.3 mm) worden gebruikt voor het bepalen van de compressiemodulus; E_c .



Figuur IV.5.2 - Schematische voorstelling compressietest (366).

De compressiemodulus is een materiaalconstante die een indicatie geeft van de volumeverandering die ontstaat bij een aangelegde hydrostatische spanning. Het omgekeerde van de compressiemodulus wordt de compressiebiliteit genoemd. Er bestaat een verband tussen de elasticiteitsmodulus en de compressiemodulus zoals reeds eerder beschreven door Friedman et al (367). Een minimum van vijf stalen wordt getest voor elk materiaaltype. Door het uitvoeren van een eenvoudige uniaxiale compressietest en het gebruik van de Mooney-Rivlin vergelijking (368) kan de elastische respons van de hydrogelen op een eenduidige manier bepaald worden met volgende formule:

$$\sigma = \frac{F}{A} = G\left(\lambda - \frac{1}{\lambda}\right) \quad [\text{IV.4}]$$

Waarbij σ de spanning is en λ de deformatie uitgedrukt als de vervormde lengte gedeeld door de initiële lengte (l/l_0). De elasticiteitsmodulus G is 1/3 van de Young's compressie modulus E_c .

Tabel IV.5.1 - Compressiemodulus E_c voor verschillende Pluronic® F127 vernet systemen (n=5).

Type van de macromonomeren Pluronic® F127	E_c [kPa]	S [\pm]
Bismethacrylaat [20% (g/g)]	320	12
Bismethacrylaat [30% (g/g)]	350	14
Bisacrylaat - tetrathiol [30% (g/g), 1.0 eq]	445	32
di-IPTS [30% (g/g)]	452	40

De resultaten zijn weergegeven in Tabel IV.5.1. De compressiemodulus voor een hydrogel bekomen uit een 30% (g/g) bismethacrylaat oplossing is significant ($p < 0.05$) verschillend ten opzichte van een 20% (g/g) oplossing. Voor eenzelfde concentratie aan uitgangsmoneer (30% (g/g)) zal een hydrogel bekomen uit een bisacrylaat-tetrathiol, alsook het siloxaan derivaat, een significant ($p < 0.05$) hogere compressiemodulus vertonen. Dit is te verklaren doordat er meer vernetting zal optreden bij hogere concentraties aan monomeren. Een interconnectie tussen de lange ketens veroorzaakt een daling in de ketenmobiliteit, waardoor er een stijging van de compressiemodulus van het polymmer zal optreden (369). Het vernetten van Pluronic® F127 door een eindmodificatie met een dubbele binding zal zwakkere hydrogelen vormen ten opzichte van een drievoudige functionaliteit. De resultaten van Sosnik et al (202) voor een Pluronic® F127 hydrogel, vernet door een redox systeem, liggen in dezelfde lijn met de de bekomen waarden.

IV.6. Conclusies.

Irgacure 2959 kan aangewend worden als foto initiator voor een radicalaire vernettingsreactie waarbij poly(Pluronic[®] F127 BMA) hydrogelen worden bekomen in hoge gel fracties. Oplossingen met een hogere concentratie aan Pluronic[®] F127 BMA zullen significant sneller een maximale gel fractie bereiken dan lagere concentraties. De temperatuur heeft een belangrijke invloed op het zwelgedrag van de bekomen hydrogel. Bij 20°C zal de hydrogel meer water absorberen dan bij 37°C en zal bij evenwichtszwelling 30% hoger liggen voor een vernette 30 % (g/g) Pluronic[®] F127 BMA. De evenwichtszwellingsgraad daalt van 780% \pm 10% naar 250% \pm 15% voor een 30 % (g/g) Pluronic[®] F127 BMA indien de temperatuur stijgt van 2°C naar 60°C. De hydrogelen zullen water uitstoten door opwarmen en geven aanleiding tot krimp.

De hydrogelen werden aangewend voor de gecontroleerde afgifte van macromoleculen. De kinetiek wordt gestuurd door de vernettingsdichtheid en het moleculair gewicht. Er werden twee verschillende moleculaire gewichten van FITC dextraan onderzocht als model; FD40 en FD260. Het dextraan FD40 vertoont een 'burst-release' diffusiepatroon, terwijl de vrijstelling van dextraan FD260 vertraagd verloopt uit een 30% (g/g) Pluronic[®] F127 BMA hydrogel. Als modelproteïne voor de vrijstelling van proteïnen uit hydrogelmatrices werd runderalbumine (BSA) geselecteerd. Er werd besloten dat een lagere polymeerconcentratie aan Pluronic[®] F127 BMA aanleiding geeft tot een snellere cumulatieve vrijstelling van BSA in functie van de incubatietijd. De aanwezigheid van een ester bevattende reactiepartner maakt de hydrogel gevoelig voor hydrolytische degradatie. De evenwichtszwelling is omgekeerd afhankelijk van de vernettingsdichtheid; zodra degradatie verder gaat en de esterbinding hydrolyseert, zal de vernettingsdichtheid afnemen, met als gevolg dat de evenwichtszwelling zal toenemen.

De vrije radicalen gecreëerd door het UV foto-initiator proces kunnen schadelijk zijn voor een gecombineerd gebruik met cellen. Daardoor is er gekozen voor het ontwerp van initiatorvrije polymerisatiesystemen. Eén van deze alternatieven is een Michaël type reactie.

Pluronic® F127 bithioacetaat kan volledig ontschermd worden in DMEM. Echter werden er geen consistente hydrogelen bekomen na inmenging van een commerciële acrylaatvernetter. Een andere weg werd vervolgens geopteerd waarbij we een Pluronic® F127 bisacrylaat combineren met een commerciële thiolvernetter door emulsificatie. Consistente hydrogelen werden bekomen met een hoge gelfractie. De Michaël-additie reactie wordt gekatalyseerd in licht basisch milieu en gaat door zonder het toevoegen van een radicaalinitiator. Hierdoor kan een vernetting met celencapsulatie onder milde omstandigheden uitgevoerd worden. Ten opzichte van de methacrylaat gebaseerde systemen kunnen er met een thiol-acrylaat benadering hydrogelen bekomen worden tot 10 cm dik. Een ander initiatorvrij systeem maakt gebruik van Pluronic® F127 di-IPTS. Door hydrolyse kunnen er reactieve silanolgroepen ontstaan die vervolgens polymeriseren door een polycondensatiereactie. De lange reactietijden maken deze systemen ongeschikt voor de finale toepassing.

Texturometrische evaluaties werden uitgevoerd op de Pluronic® hydrogelen. Hierbij werd er geconstateerd dat hydrogelen bekomen uit macromonomeren met een eenvoudige functionaliteit (het acrylaat en methacrylaat derivaat) een lagere compressiemodulus hebben ten opzichte van deze met een meervoudige functionaliteit (acrylaat-tetrathiol en IPTS).

V Ontwikkeling van extracellulaire matrix mimetische structuren.

V.1. Inleiding.

De respons van organismen op een biomateriaal is sterk geassocieerd met de oppervlaktekarakteristieken van het materiaal (370). Bij het toepassen van polymeren als een artificieel implantaat is een oppervlaktemodificatie een cruciaal aspect (371-372) om de bioactieve eigenschappen zoals celadhesie, celproliferatie en celviabiliteit te promoten. De encapsulatie van cellen en weefsel in een geschikte matrix met retentie van de celviabiliteit en metabolische functionaliteit hebben uitgebreide klinische toepassingen en speelt een belangrijke rol in een brede waaier van transplantatietherapieën. Het doel van dit hoofdstuk is om extracellulaire matrix mimetische structuren ontwikkelen voor het gecombineerd gebruik met Pluronic® hydrogelen.

De preliminaire biologische evaluaties opgenomen in dit hoofdstuk worden uitgevoerd in samenwerking met dr. Elke Berneel van de Vakgroep Medische Basiswetenschappen, Faculteit Geneeskunde, UGent.

V.1.1. Oppervlaktemodificaties voor de ontwikkeling van ECM mimetische structuren en het bioherkenningsproces.

Oppervlaktemodificaties kennen een snelle ontwikkeling in de wereld van de biomaterialen. Tientallen reviewartikels zijn reeds gewijd aan dit onderwerp (373). Er is gerapporteerd dat polymeren met een hydrofiel oppervlak een lage adsorptie vertonen van serum proteïnen, naast een lage interactie met cellen (346-348). In een publicatie door Ikada (374) wordt er aangetoond dat een materiaaloppervlak de meest kritische

invloed heeft op de biocompatibiliteit. Alsook is het voor vele polymeren een essentieel element om het aan te wenden als een biomateriaal. In 1996 verklaarden Elbert en Hubbell (375) de interactiemechanismen tussen cellen en biomateriaaloppervlakken. Principes van proteïne adsorpties op het biomateriaaloppervlak en de biologische herkenning tussen de cellen en de geadsorbeerde proteïnen worden in deze publicatie beschreven. Er worden veel oppervlaktemodificaties vermeld voor het maken van een super hydrofiel of hydrofoob materiaal, voornamelijk voor de bereiding van bloedcompatibele materialen. In 1998 interpreteerde Vogler (376) de balans tussen de hydrofiliciteit en hydrofobiciteit op de biocompatibiliteit uit een perspectief van een watermoleculaire structuur dicht bij het oppervlak. In een review van 2002 introduceerde Kasemo (370) de interacties tussen een biomateriaaloppervlak en watermoleculen, proteïnen, cellen en weefsels.

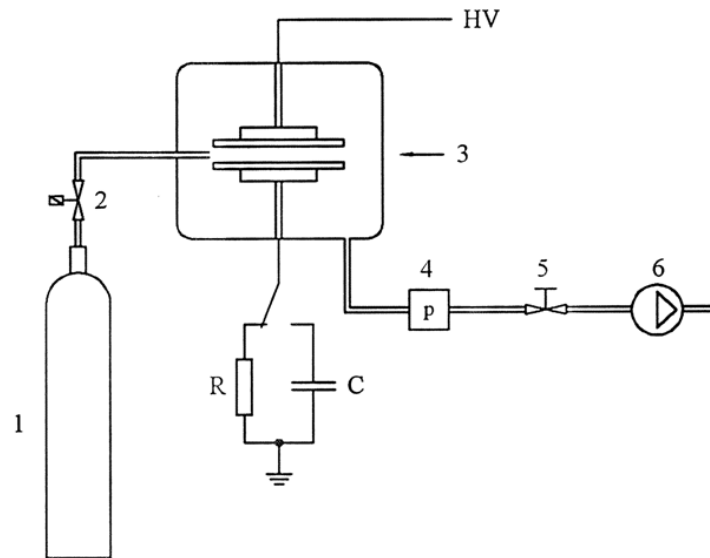
De hydrofiliciteit/hydrofobiciteit is de initiële parameter die de proteïne adsorptie zal beïnvloeden. Het is bekend dat hydrofobe oppervlakken de adsorptie van proteïnen zal bevorderen uit een waterige oplossing. Echter zal deze sterk irreversibele adsorptie zorgen voor denaturatie van de proteïneconformatie en een verlaagde bioactiviteit doordat de natuurlijke conformatie van een proteïne van essentieel belang is voor zijn bioactiviteit (377). Anderzijds zal een hoog hydrofiel oppervlak proteïnemoleculen verdrijven en de proteïne adsorptie tegenwerken. Door Vogler (376) werd voorgesteld dat de hydrofobe/hydrofiele balans kan gedefinieerd worden door gebruik te maken van een belangrijke parameter: de 'pure water adhesion tension' (τ^0). Oppervlakken met $\tau^0 > 30$ dyn/cm worden gedefinieerd als hydrofiel en deze met $\tau^0 < 30$ dyn/cm als hydrofoob. Naast de hydrofiliciteit/hydrofobiciteit spelen andere materiaaloppervlakte eigenschappen zoals de chemische samenstelling, oppervlaktelading en ruwheid, ... een belangrijke rol. Deze kunnen aangepast worden op een zodanige manier dat de geadsorbeerde proteïnen hun normale bioactiviteit behouden. Een andere strategie bestaat erin om direct biomoleculen te immobiliseren op het biomateriaal oppervlak voor de introductie van een specifieke cellulaire respons (378).

Verschillende toepassingsdomeinen, waaronder medische implantaten, bio-sensoren, bio-chips, weefselregeneratie en bio-elektronica worden beschreven om het bioherkenningsmechanismeprincipe te illustreren als een centraal aandachtspunt voor het maken van een gesofisticeerde, functionele oppervlakken voor specifieke bio-interacties (379).

Het is bekend dat de interactie tussen cellen en oppervlakken gestuurd wordt door een bioherkenningsproces. Meer bepaald betreft dit een specifieke binding van de receptoren op celoppervlakken met hun corresponderende liganden (375).

V.1.2. Atmosferische druk plasmabehandeling voor het modifieren van een biomateriaaloppervlak.

Doordat vele synthetische polymeren hydrofoob zijn, is er veel onderzoek verricht om de hydrofiliciteit van het biomateriaal te verhogen (380-382). Een veel aangewende techniek is een plasmabehandeling (383). In dit werk wordt er gebruik gemaakt van een atmosferische druk plasma reactor voor het introduceren van reactieve groepen op een oppervlak. Plasma bevat elektronen, ionen, radicalen, fotonen, ... dewelke in staat zijn om chemische en fysische modificaties op een oppervlak te initiëren (384). Het voordeel van deze techniek is dat een plasmabehandeling enkel de bovenste atoomlagen van een materiaaloppervlak zal wijzigen zonder de bulkeigenschappen te veranderen (385-386). Een schematisch diagram van de plasma opstelling is weergegeven in Figuur V.1.1. In het algemeen zal een 'dielectric barrier discharge (DBD)' gegenereerd worden in een parallelle plaat opstelling door het toepassen van een voldoende groot alternerende spanning op de elektroden (387-390). Dit resulteert in een tijdelijke en ruimtelijke niet uniforme ontlading in de ruimte tussen de elektrodes (387-390). Veel gebruikte gassen zijn helium, argon of stikstof (391). De introductie van initiatoren (radicalen of peroxidegroepen) op een chemisch inert oppervlak kan gerealiseerd worden door een Ar plasma behandeling in combinatie met zuurstof (392-395). Bij gebruik van enkel argon als gas (inert) zullen er geen chemische reacties optreden.



Figuur V.1.1 - Schematisch diagram van de experimentele opstelling gebruikt voor een DBD plasma ontleding (370) (1: gascilinder, 2: massastroom controle, 3: plasmareactor, 4: drukleiding, 5: klep, 6: pomp).

V.1.3. Analysetechnieken voor de karakterisatie van een biomateriaaloppervlak.

Door de invloed van de topografische eigenschappen op het celgedrag, is de morfologische karakterisatie van het biomateriaaloppervlak van essentieel belang. Het meest aangewende toestel voor het bestuderen van de oppervlaktemorfologie is SEM (396). De resolutie van SEM is meestal in microschaal in de richting verticaal aan het materiaaloppervlak. In tegenstelling tot AFM, dewelke een veel hogere resolutie heeft in deze richting en makkelijker oppervlaktestructuren van verschillende nanometers in hoogte of diepte kan detecteren (397-398). Een extra voordeel van AFM ten opzichte van SEM is het feit dat men deze kan gebruiken in waterig midden, hetgeen een realistischere omgeving is waar biomaterialen toegepast worden (399).

Naast de oppervlaktetopografie van biomaterialen is de bepaling van de chemische samenstelling van fundamenteel belang. Attenuatie van de totale reflectie, Fourier Transform spectroscopie (ATR-FTIR), X-straal foto-elektron spectroscopie (XPS) en 'time-of-flight' secundaire ionenmassaspectroscopie (TOF-SIMS, kortweg: SIMS) zijn de meest wijdverspreide spectroscopische technieken die voor deze doeleinden worden toegepast.

XPS wordt meestal geprefereerd als analytische techniek voor organische materialen doordat de x-stralen het oppervlak niet beschadigen.

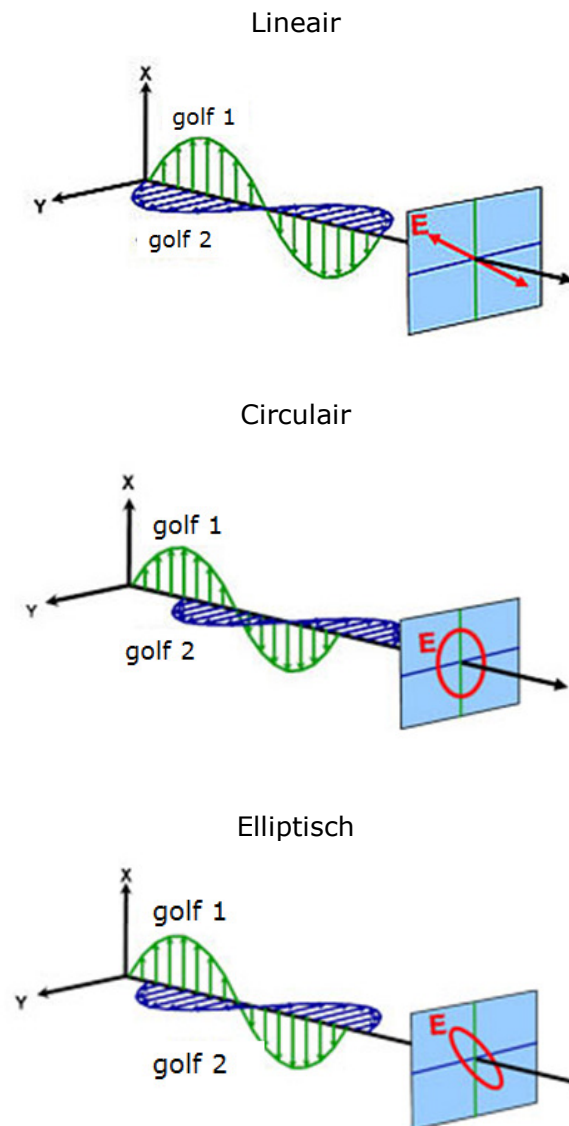
De meest aangewende technieken voor het meten van de laagdikte en ultradunne films zijn X-straal, neutronenscattering (400), ellipsometrie (376-378) en ATR. Echter is er maar weinig gepubliceerd rond het meten van laagdiktes op een polymeer gebaseerd biomateriaal, te wijten aan de ruwe aard van zowel het substraat en de geënte lagen. Daarnaast is een karakterisatie van het gemiddelde moleculair gewicht van geënte polymeren op biomateriaaloppervlakken een eigenschap die niet frequent wordt beschreven.

In dit werk maakt men gebruik van ellipsometrie voor het bepalen van de laagdiktes. Ellipsometrie is een niet destructieve optische meettechniek die gepolariseerd licht gebruikt om de diëlektrische eigenschappen van een monsteroppervlak te bepalen (401). De techniek kan zowel toegepast worden in de micro-elektronica als in de biologie. Uit de polarisatierichting van het gereflecteerde licht kan informatie bekomen worden over de oppervlaktelaag met een dikte zo dun als de gebruikte golflengte of nog dunner (tot een atoomdiameter). Ellipsometrie is in eerste instantie bedoelt om de optische constanten te bepalen en de filmdikte, maar kan ook de compositie, kristalliniteit, ruwheid, dopingconcentratie en andere materiaaleigenschappen bepalen die gelinkt zijn met een verandering in de optische respons.

Licht kan beschreven worden als een elektromagnetische golf. De manier waarop elektromagnetische velden zich gedragen in relatie met ruimte en tijd kan men definiëren als polarisatie. Licht wordt beschouwd als niet gepolariseerd wanneer de oriëntatie en fase totaal arbitrair zijn. Ellipsometrie daarentegen meet gepolariseerd licht; een elektrisch veld dat een specifieke weg zal volgen en die een verschillende vorm zal hebben bij een gegeven punt. Een elektromagnetische golf die zich voortbeweegt in de z-richting kan beschreven worden door zijn x- en y-componenten, doordat zijn elektrisch veld altijd orthogonaal gericht is aan de propagatie richting.

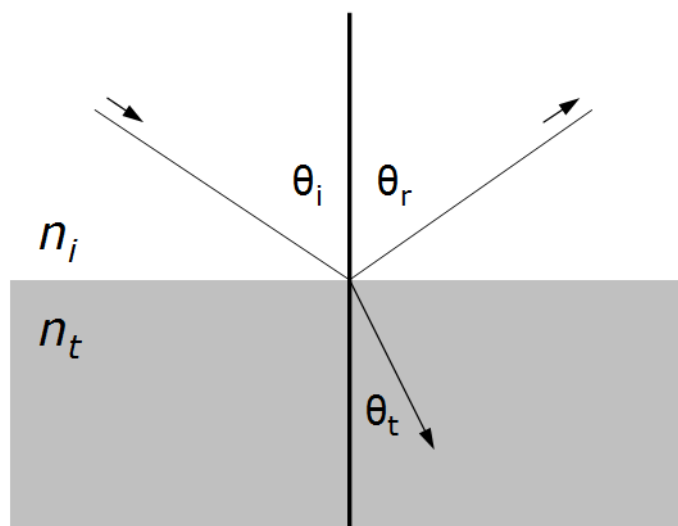
Indien twee orthogonale lichtgolven in fase zijn, zal het resulterende licht lineair gepolariseerd zijn. Zijn oriëntatie is bepaald door de relatieve amplitudes. Het licht is

circulair gepolariseerd indien de orthogonale golven 90° uit fase zijn en dezelfde amplitude hebben. De meest bekende polarisatie is elliptisch en combineert orthogonale golven van arbitraire amplitudes en fase. Hieraan dankt ellipsometrie zijn naam (Figuur V.1.2).



Figuur V.1.2 - Verschillende types van lichtpolarisatie (402).

Telkens als licht in wisselwerking treedt met een materiaal, zal dit leiden tot randvoorwaarden aan het raakvlak. Gedurende deze wisselwerking dient er altijd voldaan te worden aan de vergelijkingen van Maxwell. Figuur V.1.3 toont hoe een willekeurig licht zal reflecteren en refracteren aan het raakvlak. De hoek tussen de invallende straal en het gewone staal (θ_i) zal gelijk zijn aan de reflecterende hoek (θ_r).



Figuur V.1.3 - Licht reflectie en refractie volgens de wet van Snell (402).

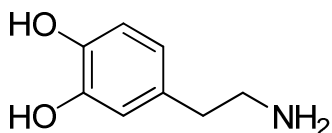
Bij elk raakvlak zal een deel licht gereflecteerd worden terwijl de rest zal overgedragen worden bij de gebroken hoek. Afhankelijk van de grenscondities zullen verschillende oplossingen toegepast kunnen worden voor de elektrische velden parallel en loodrecht aan het staaloppervlak. Licht kan gescheiden worden in orthogonale componenten met relatie tot het vlak van voorkomen (p- en s-polarisatie). Beide componenten kunnen afzonderlijk berekend worden. Hieruit kan met de laagdikte berekenen.

V.2. Het toepassen van poly(dopamine) coatings voor het functionaliseren van een biomateriaaloppervlak.

Oppervlaktemodificaties spelen een centrale rol in het controleren van de oppervlakte eigenschappen en verlenen nieuwe functionaliteiten aan materialen (381-383). In de voorbije decennia zijn er verschillende sleuteltechnologieën ontwikkeld voor het modifieren van materiaaloppervlakken, waaronder chemische conjugatie (403), 'self-assembly monolayers (SAM's)' (404), laag-na-laag filmafzetting (405) en plasma behandeling (406). Algemeen zijn de meeste oppervlaktetechnieken tijdrovende en ingewikkelde processen en zal hun toepassing afhangen van specifieke oppervlakte

eigenschappen (404, 406). Hierdoor is een eenvoudige en universele benadering voor een oppervlaktemodificatie wenselijk.

Mossel geïnspireerd poly(dopamine) (PDA) heeft veel interesse gewekt als een nieuwe manier voor het functionaliseren van biomaterialen. Dit kan men toeschrijven aan de eenvoudige en materiaalafhankelijke afzetting, de gunstige interacties met cellen en de sterke reactiviteit voor verdere functionalisatie (407-408)(69, 388-389). Dopamine of 2-(3,4-dihydroxyfenyl)ethylamine, DOPA (Figuur V.2.1) is een catecholamine die fungeert als neurotransmitter op verschillende plaatsen in het lichaam van mensen en dieren. Het komt in het menselijk en dierlijk organisme ook voor als een precursor van de hormonen adrenaline en noradrenaline (409).



Figuur V.2.1 - Structuurformule van 2-(3,4-dihydroxyfenyl)ethylamine (dopamine, DOPA).

De waterbestendige adhesie eigenschappen van DOPA laten een goede hechting toe aan zowel organische als anorganische oppervlakken. Onderzoek werd reeds uitgevoerd om de chemie van DOPA na te bootsen met behulp van synthetische polymeren (410-414). Er werd aangetoond dat het gelijktijdig bestaan van een catechol (DOPA) en een amine (lysine) cruciaal zijn voor het bereiken van een sterke adhesie (415-417). Poly(dopamine) (DOPA) als een eenvoudige éénstaps oppervlaktescoating werd ontdekt in 2007 (417). De PDA-coating kan aangewend worden voor het functionaliseren van een brede reeks van materiaaloppervlakken, waaronder super hydrofobe oppervlakken. Poly(dopamine) heeft een nieuwe weg geopend voor oppervlakte modificaties en heeft interesse gewekt in de materiaalwetenschappen, biologie en het biomedische domein. Dopamine chemie is uitgebreid onderzocht voor oppervlakte modificatie (417-418). Dopamine kan zelfpolymerisatie ondergaan voor het produceren van een adherente

poly(dopamine) laag op veel substraten. Door gebruik te maken van deze unieke eigenschap, kan men verschillende moleculen zoals groeifactoren en andere biomoleculen geïmmobiliseerd worden op oppervlakken voor het bereiken van verschillende eigenschappen (399-401).

Hoewel de bereiding van PDA-coatings een eenvoudig éénstapsproces is, zullen verschillende factoren (temperatuur, DOPA-concentratie, pH, buffer en toegepast oxidans) een belangrijke rol spelen voor het controleren van de oppervlaktekarakteristieken van de PDA-coating. Verhoogde temperaturen kunnen de afzetting van PDA op het substraat versnellen, hetgeen resulteert in een ruwer en meer hydrofiele PDA laag in vergelijking met coatings gevormd bij verlaagde temperatuur (419). Sommige studies tonen aan dat de initiële reactiesnelheid van PDA-vorming een plateauwaarde kan bereiken voor dopamine concentraties hoger dan 1 g/L (420), terwijl anderen een lineaire toename waarnemen van de PDA coatings dikte met een dopamine concentratie van 0.1 tot 5.0 g/L (421). Recent werd er aangetoond dat de tweefasige evolutie van de PDA coatings dikte, alsook de oppervlakteruwheid met toenemende initiële dopamine concentraties (0.25 - 4 g/L), met de initiële concentratie van 1.0 g/L resulteert in de grootste coatings dikte en ruwheid (422). Deze discrepantie kan het gevolg zijn van verschillende zuurstofconcentraties in de reactieoplossing gehandhaafd in verschillende studies, doordat het oxidans (type, concentratie, ...) gebruikt in de reactieoplossing een andere belangrijke cruciale factor is voor PDA-vorming. In de afwezigheid van zuurstof zal er geen zichtbare PDA-depositie waargenomen worden, terwijl bij hogere zuurstofconcentraties in de dopamine oplossing zal leiden niet enkel tot een verhoogde depositiesnelheid, maar ook aan een meer uniforme en gladde coating (423). Sommige oxidansen zoals metaalionen, ammoniumpersulfaat hebben ook bewezen om effectief te zijn in PDA-vorming en resulteren in een duidelijke depositiekinetiek en optische eigenschappen (424-426). Bijkomend zal de pH en het type toegepaste buffer een betekenisvolle invloed hebben op de depositiekinetiek van het PDA-coating proces. De depositiesnelheid zal de hoogste waarden bereiken voor pH-

waarden ~ 8.5 en het vervangen van TRIS-buffer door een fosfaat buffer zal ook resulteren in een hogere depositiesnelheid (424, 427).

PDA zal als een hoofdcomponent van het natuurlijk voorkomende melanine (dat wijdverspreid is in het menselijke lichaam), een uitstekende biocompatibiliteit hebben. De adhesie van fibroblasten en megakaryocyten (beenmergcellen), naar PDA gemodificeerde oppervlakken is benaderd door Lee et al (417). In deze publicatie werd er aangetoond dat de cytocompatibiliteit van PDA-coatings cel afhankelijk zijn. De *in vitro* cytocompatibiliteit van PDA-coatings werd verder bestudeerd door de groep van Park (428), waarbij er humane navel endotheelcellen gekweekt worden op PDA gecoate, geëlektrospinde polycaprolacton nanovezels. Deze blijken een verhoogde adhesie en viabiliteit te hebben ten opzichte van ongewijzigde en gelatine gecoate nanovezels. Er werd aangetoond dat PDA-coatings een krachtige manier zijn voor het omzetten van bio-inerte substraten in bioactieve draagstructuren (429), door het promoten van celadhesie van verschillende celtypes, zoals: osteoblasten, feochromocytomen en chondrocyten. De biodegradeerbaarheid is een belangrijk aspect voor *in vivo* toepassingen. Een gedetailleerde evaluatie van dit aspect is nog steeds ontbrekend maar cruciaal, doordat ongepolymeriseerd dopamine hoog cytotoxisch is (430).

V.2.1. De autopolymerisatiemechanismen van dopamine.

Ondanks het uitgebreide onderzoek in de afgelopen decennia, zijn de hechtingseigenschappen van polydopamine aan substraten niet volledig begrepen (431-432). Het merendeel van de bewijzen duiden in de richting van een complexe filmdepositie waarbij de aanwezigheid van primaire aminefuncties en catecholfuncties een centrale rol spelen. De gedetailleerde chemische interacties die ten grondslag liggen aan de filmvorming zijn tot op heden nog niet opgehelderd.

De fundamentele vraag rond de polydopamine structuur is of het een polymeer betreft of een hiërarchische supramoleculaire structuur en amorf aggregaat. In het geval polydopamine een polymeer is (er is tot op heden geen experimenteel bewijs

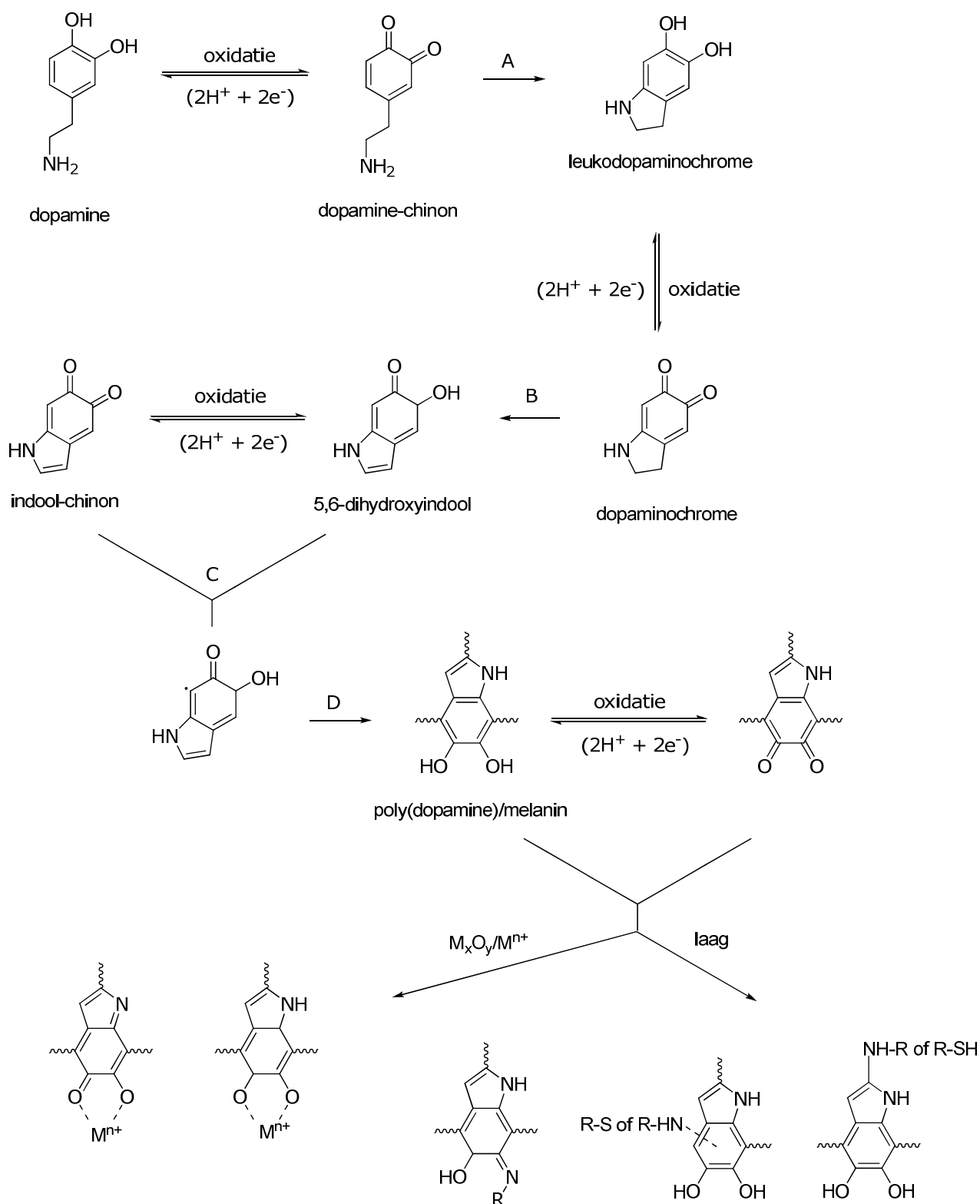
beschikbaar) zou dit zijn naam volledig rechtvaardigen voor de films die gevormd worden tijdens de oxidatie van dopamine oplossingen in de aanwezigheid van het te coaten substraat. Daarentegen is er sterk bewijs dat polydopamine een melanine-achtig materiaal is, waarvoor het meest waarschijnlijke model een hiërarchisch substraat is van oligomeren bekomen uit 5,6-dihydroxyindool. Dit model beroept op onderzoeken die gebruik maken van scanning tunneling microscopie (433). Berekeningen uitgevoerd met de 'density functional theory' suggereren dat het meest stabiele aggregaat van 5,6-dihydroxyindool een tetrameer is met een planaire geometrie die gelijkaardig is aan ftalocyanine (434).

Het 'stacked protomolecule model' laat toe de X-straal diffractie studies te verklaren, uitgevoerd door Thatachari and Blois (435), alsook de AFM data van Clancy and Simon (436) en de 'matrix - assisted laser desorption mass spectra' data van Pezzella et al (437) In het geval waar men norepinefrine (noradrenaline) gebruikt als catecholamine, noemen de auteurs de bekomen coating 'polynorefrine' (438). Doordat er geen bewijs is dat deze coatings verschillend zijn ten opzichte van deze gemaakt uit dopamine, worden alle coatings bekomen uit catecholamines (in de aanwezigheid van een oxidans) systematisch polydopamine genoemd. Er is bewijs dat polydopamine coatings veel gemeenschappelijke eigenschappen delen met melanine:

- De compositie, gebaseerd op XPS is gelijk aan die van melanine (439).
- De oplossingen waaruit de coatings gevormd worden bevatten deeltjes die een solid-state NMR-spectrum gelijk hebben als dat van melanine (439).
- De UV-Vis en infrarood spectra van de coatings zijn gelijkaardig maar niet identiek aan deze van synthetisch melanine (440).

De moleculaire details van de assemblage van melanine in oplossing is nog steeds niet goed begrepen. Het fundamentele 5,6-indoolchinon ondergaat dimerisatie, maar er zijn verscheidene isomeren of dimeren waarvan er drie zijn stabiel genoeg zijn om bij te

dragen aan de vorming van trimeren (431). Dit benadrukt de structurele complexiteit van het bekomen melanine. De reactiviteit van dopamine (441) en 5,6-dihydroxyindool in oplossing is een zeer actief onderzoeksdomein (442-445). Correlaties dienen gemaakt te worden tussen het onderzoek in organische chemie en de oppervlaktewetenschap van de polydopamine depositie. Er is veel theoretische onderzoek uitgevoerd rond de structuur van melanine in oplossing (446), echter minder in de richting van polydopamine afzetting op oppervlakken. Het exacte mechanisme voor het binden van dopamine op een oppervlak en het vormen van poly(dopamine) is tot op heden onduidelijk. Een mogelijke reactieweg is weergegeven in Figuur V.2.2 (417, 447).



Figuur V.2.2 - Mogelijke structurele evoluties en polymerisatiemechanismen van dopamine (417, 421-422, 426-427, 448), voorgestelde bindingen tussen dopamine/poly(dopamine) en metaalsubstraat/metaalion en organische ad-layer vorming mechanismen op poly(dopamine) gecoate substraten. Intermoleculaire cyclisatie (A), herschikking (B), omgekeerde dismutatiereactie (C), polymerisatie en vernetting (D).

Oxidatieve omstandigheden (alkalische pH en de aanwezigheid van zuurstof in waterige dopamine oplossingen) induceren deprotonatie van de catecholische dihydroxylgroep protonen en vormen dopamine-chinon. Chinonen zijn vrij reactief en kunnen aangevallen worden door nucleofielen. Dopaminechinon bevat zowel een elektronenarme ring en een elektronen donerende amine groep. Wanneer de amine groep gedeprotoneerd wordt zal de molecule een intramoleculaire cyclisatie ondergaan via een 1,4-Michaël-additie, hetgeen leidt tot het leucodopaminechrome.

Leukodopaminechrome wordt eenvoudig geoxideerd tot dopaminechrome (449). De herschikking leidt tot 5,6-dihydroxyindool of met een verdere oxidatie het indool-chinon. Een reverse dismutatie reactie tussen het catechol en o-chinon van 5,6-dihydroxyindool leidt tot een vernetting en geeft poly(dopamine); een polymeer dat structureel gelijkaardig is aan het biopigment melanin (397, 414). De blootgestelde reactieve groepen van de poly(dopamine) coatings laten een verdere functionalisatie toe door middel van een covalente enting van polymeren en depositie van metaalfilmen via de reductie van metaalionen. Onder oxiderende condities zullen catecholen reageren met thiolen en amines via een Michaël-additie of een Schiffse-base reactie (450). Een immersie van poly(dopamine) gecoate oppervlakken in een thiol- of amine bevattende oplossing verschaft een eenvoudig thiol- en amine-catechol adduct en werd aangetoond voor de depositie van organische ad-lagen in de vorm van een alkeenthiole monolaag en polymeercoatings (417). Poly(dopamine) coatings worden succesvol toegepast indien de materiaaleigenschappen dienen verbeterd te worden, i.e. verschillende bioinerte substraten die omgezet worden in bioactieve door het gebruik te maken van poly(dopamine) gecoate oppervlakken voor het hechten van cellen (451). Er wordt aangenomen dat het depositieproces nagenoeg onafhankelijk is van het substraat.

V.2.2. Bepaling van de oppervlaktesamenstelling van een dopamine/poly(dopamine) coating op goud door XPS.

X-straal foto-elektron spectroscopie wordt gebruikt voor de karakterisatie van de chemische samenstelling van de dopamine/poly(dopamine) coating. Dit omdat de x-stralen geen oppervlakteschade zullen toebrengen. Voorafgaand aan de modificatie met een dopamine/poly(dopamine) film worden de goudsubstraten in detail bestudeerd. Op het goudoppervlak kan men koolstof detecteren. Het bestaan van contaminaties van de koolstofband wordt verklaard door de moeilijkheid voor het bereiden van een zuiver goudoppervlak en het behoud ervan bij bijna atmosferische druk voor XPS metingen (452). Gezien XPS een analysediepte omvat tussen de 0 en 10 nm en het gecoate substraat ook specifieke signalen vertoont van het substraat, kan men stellen dat de coating een dikte heeft van minder dan 10 nm. Om de exacte verandering in elementcompositie te bepalen van de gevormde filmen worden de stikstof-koolstof verhoudingen (N/C) berekend. Oppervlakte atoompercentages en N/C verhoudingen worden weergegeven in Tabel V.2.1.

Tabel V.2.1 – Stikstof/koolstof relatieve ratio's (N/C) voor gecoate goudsubstraten met dopamine en poly(dopamine) (n=1).

Staal	Atoom ratio (mol%) [N/C]
Dopamine goud	$0.2/4.9 = 1/24 = 0.041$
Poly(dopamine) goud	$0.7/8.9 = 1/13 = 0.079$

De theoretische N/C waarden van dopamine hydrochloride ($N/C = 1/8n = 0.125$) is niet bereikt, de gemeten verhoudingen zijn lager zijn dan de theoretische. De hogere koolstof hoeveelheid suggereerd een onvermijdelijke aanwezigheid van koolstof te wijten aan contaminatie bij het maken van stalen onder omgevingscondities.

Men dient op te merken dat de mogelijkheid van XPS voor het detecteren en kwantificeren van een aantal functionele groepen gelimiteerd is indien de relatieve chemische verschuiving van groepen beneden de bereikbare energieresolutie is (453-

454). Daardoor heeft de data een beperkte waarde voor de bepaling van de concentratie van een specifieke functionele groep. Bindingsenergie shifts van zuurstof- of stikstof bevattende functionele groepen zijn kleiner, te wijten aan hun soortgelijke elektronennegativiteit. De chemische shiften van zulke soorten zijn aanwezig in een nauw bindingsenergie venster en vele van deze pieken wijzen op soortoverlap (455). Kleine bindingsenergieverschuivingen geïnduceerd door dubbele bindingen zijn ook aanwezig in deze regio en zal zorgen voor meer complicaties bij de analyse van de nauwe scan van het C 1s venster. Alsook zal de chemische verschuiving voor stikstof bevattende functionaliteiten van de N 1s kernniveaus zeer klein zijn. In Tabel V.2.2 zijn de bindingsenergie intervallen weergegeven van de dopamine/poly(dopamine) film metingen en de toewijzingen van de corresponderende functionele groep, dewelke gevalideerd worden met data uit de literatuur (453, 456-458). De bindingsenergieschaal wordt ingetseld door het corrigeren van de CH_x piek van de koolstof 1s venster op 284,5 eV. Alle vermelde functionele groepen bindingsenergieën zijn relatief ten opzichte van deze positie.

Tabel V.2.2 – Functionele groep elektron bindingsenergieën voor de alifatische groepen bekomen door XPS (n=3).

Functionaliteit	Bindingsenergie [eV]	Referentie
CH _x	284.5 ± 0.0	(424, 458)
C-N, C=N, C-O	286.0 ± 0.2	(424, 458)
C=O	287.6 ± 0.1	(424, 458)
O=C-OH	288.8 ± 0.6	(424, 458)
Al ₂ O ₃	530.4 ± 0.1	(453)
C-O-H	531.7 ± 0.1	(456)
C=O	532.2 ± 0.1	(456)
R ₂ -NH, R ₂ -N-R'	399.7 ± 0.1	(456)
-NH ₂ , -NH ₃ ⁺	402.0 ± 0.2	(456)

De relatieve percentages van de koolstof, zuurstof en stikstof functionaliteiten gemeten op dopamine en polydopamine gecoate oppervlakken, kan terug gevonden worden in Tabel V.2.3.

Tabel V.2.3 – Analyse van de alifatische functionalisaties van een goudoppervlak, dopamine/goud oppervlak en poly(dopamine)/goud oppervlak, bekomen met XPS (n=1).

Functionele groepen [%]			
Functionele groep	Goud	Dopamine goud	Poly(dopamine) goud
C1s			
CH _x	77	80	69
C-N, C=N, C-O	11	14	21
C=O	7	4	7
O=C-OH	5	2	3
O1s			
Al ₂ O ₃	0	0	0
C-O-H	0	58	22
C=O	0	42	78
N1s			
R ₂ -NH, R ₂ -N-R'	0	91	94
-NH ₂ , -NH ₃ ⁺	0	9	6

Zoals we kunnen zien in Tabel V.2.3 zijn alle functionele groepen van dopamine en poly(dopamine) duidelijk aanwezig in de spectra op beide substraten. De regiospectra worden omgezet met de corresponderende moleculen voorgesteld in het poly(dopamine) oxidatie schema (Figuur V.2.2). Alsook kunnen de pieken van het substraatoppervlak beïnvloed worden doordat de gevormde organische film dun is (5 tot 7 nm) en XPS metingen zullen uiterst tot 10 nm van het geanalyseerde oppervlak van de aangewende invalshoek (459).

Een duidelijk gevolg van filmdepositie is de verandering in oppervlakte-energie van het gecoate materiaal. Statische water contacthoekmetingen op een goudsubstraat en op een poly(dopamine) coating zijn opgenomen in Tabel V.2.4.

Tabel V.2.4 - Statische water contacthoekmetingen op goud en poly(dopamine) coatings (n=3).

	Contacthoek [°]
Goudsubstraat	53.7 ± 1.8
Poly(dopamine) coating	68.6 ± 1.9

Zuiver goud is hydrofiel (0°) en een partiële monolaag van koolstofhoudende contaminatie maakt het hydrofoob (tot 66° (460)), dit ligt in lijn met het bekomen resultaat. Het dopamine is geadsorbeerd op het substraat en zal een cohesieve kracht ontwikkelen door zelfpolymerisatie. De statische contacthoek gemeten op poly(dopamine) filmen met water als solvent verwijzen meestal naar contacthoekwaarden van 50-55° indien poly(dopamine) afgezet wordt op hydrofiele substraten (417, 439, 461). Op goud zal de statische contacthoek voor water waarden bereiken van 46-51° na contact met een dopamine oplossing (462). De significante ($p < 0.05$) toenemende hydrofobiciteit van coatings op goud, opgenomen in Tabel V.2.4 kan een indicatie zijn van verschillende moleculaire organisaties te wijten aan de aard van het substraat. De oppervlakte-energie van poly(dopamine) door gebruik te maken van verschillende solventen (water, diiodomethaan en formamide) is geëvalueerd door Bourmaud et al (463). Hieruit werd afgeleid dat poly(dopamine) coatings eerder polair en hydrofiel van aard zijn.

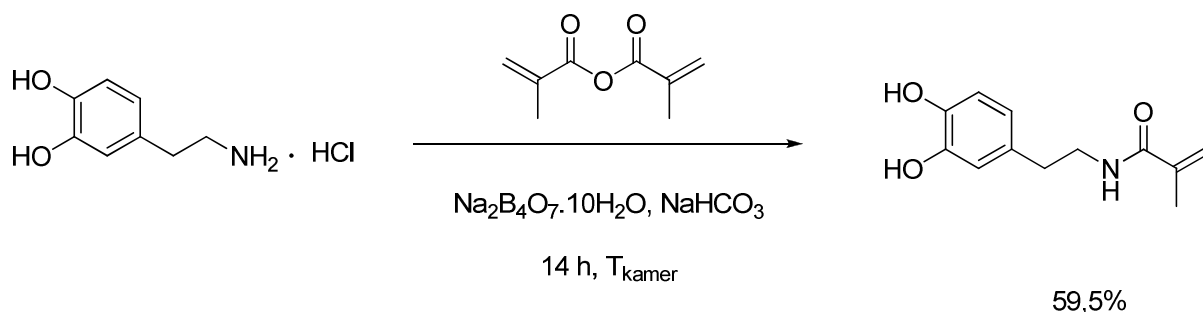
V.2.3. Synthese en karakterisatie van dopamine methacrylamide.

Verschillende methoden voor het modificeren van goud, siliconen, polyurethaan en polydimethylsiloxaan (PDMS) zijn beschreven in de literatuur (464-467). Echter zijn de

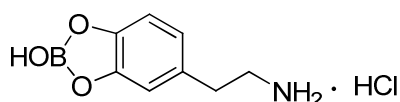
gerapporteerde methoden complex en omvatten ze meerdere stapsreacties. Alsook zijn deze methoden meestal ontwikkeld voor een specifiek materiaal. Daardoor is er een noodzaak om een eenvoudige, substraat-onafhankelijke oppervlaktemodificatie strategie te ontwikkelen. Dopamine coatings worden aangewend voor het enten van een ATRP initiator voor een gecontroleerde radicalaire polymerisatie. Hierbij worden er goed gedefinieerde polymer brushes bekomen op verschillende oppervlakken via de 'grafting from' benadering (468-471).

Een methacrylamidederivaat van dopamine zal door het adheren van de catecholfunctie aan een oppervlak een vrije methacrylamidefunctie beschikbaar stellen voor verdere functionalisatie via een polymerisatiereactie. Een bijkomende mogelijkheid is dat het dopamine derivaat eenvoudig kan gecopolymeriseerd worden met andere monomeren.

In dit werk wordt dopamine chemisch gemodificeerd met methacrylzuuranhydride. Deze reactie (Figuur V.2.3) is gebaseerd op een gewijzigde methode opgenomen in literatuur door Lee et al (418).



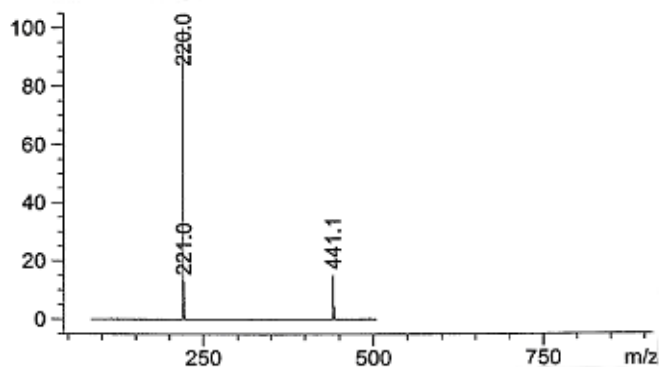
Figuur V.2.3 - Modificatie van dopamine met methacrylzuuranhydride naar het dopamine methacrylamide DAMA.



Figuur V.2.4 - Stabilisatie van de catecholfunctie van het dopamine door een cyclische boraatester.

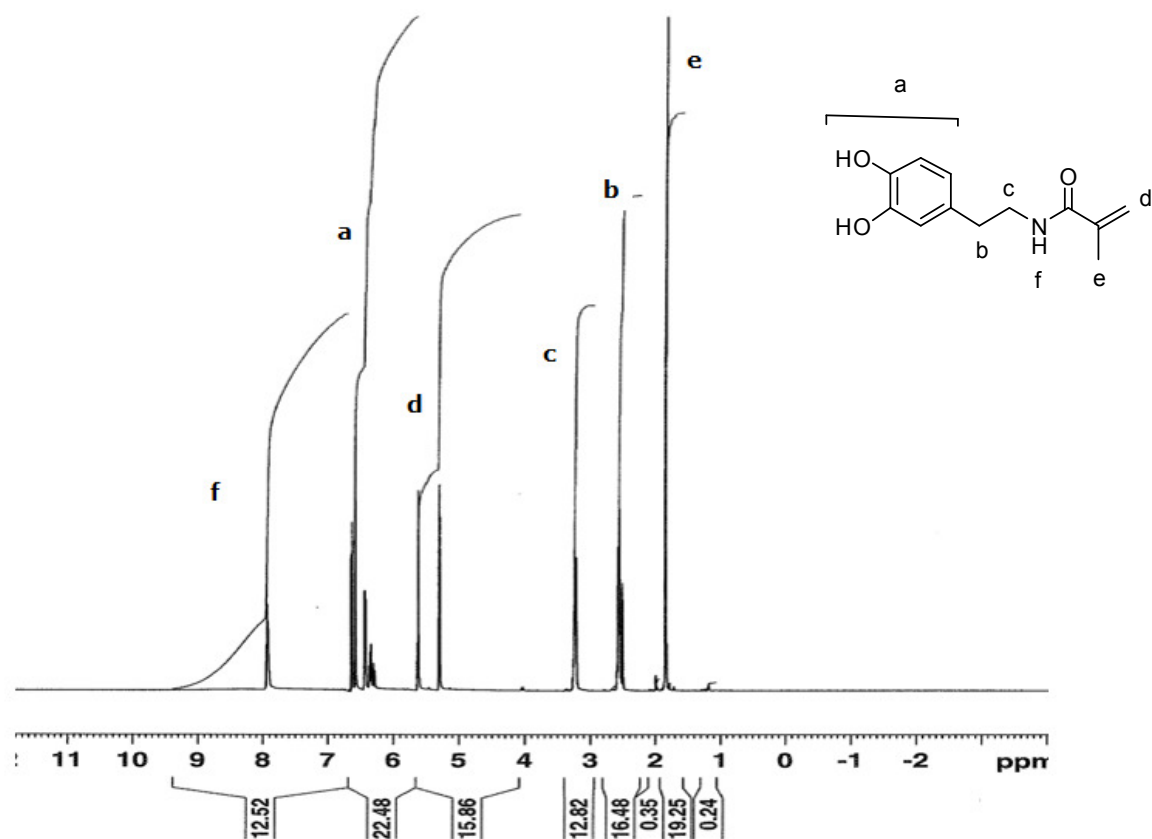
De reactie gaat door onder licht basische condities met 3,4-dihydroxyfenylethylamine hydrochloride en methacrylzuuranhydride in een waterige oplossing van natriumtetraboraat. De twee hydroxylfuncties van het dopamine is onstabiel in neutrale of alkalische omstandigheden. Het natriumtetraboraat beschermt de catecholfunctie van dopamine, door het vormen van een cyclische boraatester (Figuur V.2.4), hetgeen stabiel is in neutrale en alkalisch midden (472). De boraatester wordt makkelijk gehydrolyseerd door een verdund zuur. Het gederivatiseerde product wordt bekomen in hoge zuiverheid (> 99%) als een water onoplosbaar product.

In Figuur V.2.5 is het massaspectrum weergegeven, de massa van 220.0 duidt op een efficiënt doorgevoerde reactie, de exacte massa van $C_{12}H_{15}NO_3$ is 221.11, alsook de dubbele massa bij 441.1, gevormd door recombinitie.



Figuur V.2.5 – Het massaspectrum van dopamine methacrylamide.

Bijkomende aanwijzingen voor een succesvolle reactie kan men terugvinden in het 1H -NMR spectrum (Figuur V.2.6) en een overzicht van de toekenning van de protonen in Tabel V.2.5.



Figuur V.2.6 - ^1H -NMR (500 MHz) spectrum en toewijzing van de protonen van dopamine methacrylamide in d-DMSO.

Tabel V.2.5 - Toewijzing van de pieken in het ^1H -NMR spectrum van dopamine methacrylamide.

δ ppm	Multipliciteit	Integratie	Toekenning
1.85	s	3	H _e
2.56	t	2	H _b
3.23	q	2	H _c
5.31	s	1	H _d
5.62	s	1	H _d
6.43	d	1	H _a
6.58	s	1	H _a
6.63	d	1	H _a
7.94	m _{breed}	1	H _f

V.2.4. Introductie van koolstof-koolstof dubbele bindingen op een goudoppervlak door dipcoating met dopamine methacrylamide.

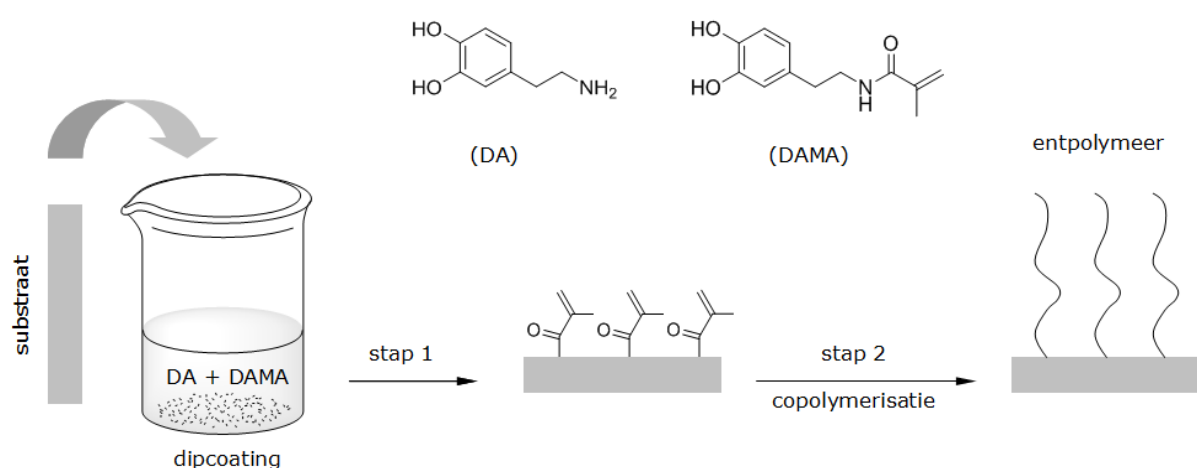
Eenvoudige methoden voor het modificeren van een oppervlak voor het introduceren van functionele eigenschappen hebben een toenemende aandacht getrokken voor de materiaalwetenschap en biomedische toepassingen (473).

De entmethoden kan men onderverdelen in twee klassen, beter bekend als 'grafting to' en 'grafting from' (474). In het geval van een 'grafting to' methode, zullen de aangewende polymeerketens een reactieve ankergroep bevatten op het einde (of zijketens) van de keten die covalent gekoppeld wordt op een substraat door bijvoorbeeld silaan koppelingsreagentia. Een plasmabehandeling kan ook actieve componenten introduceren op een polymeeroppervlak, gevolgd door een polymerisatiereactie. Echter zal de complicatie die inherent verbonden is aan het 'grafting to' proces een intrinsieke beperking genereren van het aantal functionele groepen per eenheid van oppervlak door thermodynamische redenen (475). Aan de andere kant zal de 'grafting from' methode gebruik maken van reactieve componenten die zich bevinden op het polymeeroppervlak met een hoge entingsdichtheid voor het initiëren van de polymerisatie van monomeren van het oppervlak. 'Grafting from' kan doorgaan door het substraat te behandelen met plasma en gloei-ontlading voor het genereren van geïmmobiliseerde initiatoren, gevolgd door polymerisatie (476). Verschillende methoden, waaronder: gasplasma, ozon, elektronenstraal, UV licht en gamma stralen, zijn onderzocht voor het activeren van het oppervlak voor verdere functionalisatie (477).

Echter zal de immobilisatie van initiator op het oppervlak meerdere stappen inhouden (478), wat kan leiden tot lage entingsdichtheden van initiator. Alsook kunnen nevenreacties, dewelke mogelijks bestaan in de initiator immobilisatie reactie, enkele ongewenste structuren introduceren op het oppervlak. Door 'self assemble monolayer' technieken (479) kunnen deze problemen omzeild worden.

Dopamine ondergaat een zelfpolymerisatie in alkalische, aërobische condities en vormt een dunne poly(dopamine) film op een breed gamma van anorganische en organische

materialen (417-418). Geïnspireerd op deze eigenschap van dopamine werd er in dit werk een methode ontwikkeld voor het modifieren van substraten (zie Figuur V.2.7). In deze methode is het catechol bevattende methacrylamidemonomeer DAMA en dopamine (DA) betrokken. DAMA moleculen worden gehecht op het materiaal door dipcoaten in alkalisch midden die DAMA en DA bevatten (pH 8.0 tot 8.5) voor een welbepaalde periode. De koolstof-koolstof dubbele bindingen die hierdoor geïntroduceerd worden laten copolymerisatie toe met andere functionele monomeren. Deze oppervlaktemodificatie strategie is weinig toegepast. De vermelde artikels focuseren zich op het modifieren van inorganische nanodeeltjes (480-481). In dit werk gebruikt men deze methode voor het functionaliseren van Pluronic® F127 hydrogelen.



Figuur V.2.7 - Immersie van het substraat in een oplossing van dopamine methacrylamide laat de introductie toe van koolstof-koolstof dubbele bindingen die in een daaropvolgende copolymerisatiestap kunnen aangewend worden voor het invoeren van verschillende monomeren.

In dit werk wordt goud gebruikt als modelsubstraat voor de functionalisatie met DAMA. De succesvolle afzetting van DAMA op goudoppervlakken kan aangetoond worden door middel van XPS metingen. Naast de aanwezigheid van stikstof bij 400 eV in het XPS spectrum, bevestigt ook de afname van het Au signaal en de toename van het koolstof- en zuurstofsignaal dat DAMA covalent gebonden is aan het goudoppervlak (Tabel V.2.6).

Tabel V.2.6 – Oppervlaktesamenstelling, uitgedrukt in atomaire percentages, van Au en DAMA gemodificeerd Au bepaald door middel van XPS (n=1).

Oppervlak	C [%]	O [%]	N [%]	Au [%]
Au	31.64	5.62		62.74
Au-poly(DAMA)	60.80	16.78	6.42	16.00

Via een éénstapsreactie kan men op een eenvoudige manier koolstof-koolstof dubbele bindingen incorporeren op een goudoppervlak door het gebruik te maken van dopamine methacrylamide. Dit opent de mogelijkheid voor de introductie van verschillende functionaliteiten door copolymerisatie met monomeren. De introductie van DAMA op goudoppervlakken wordt ook bestudeerd aan de hand van SCA metingen.

Tabel V.2.7 - Contacthoeken van water op Au, Au met DBD plasma voorbehandeling en DAMA gemodificeerd Au na DBD voorbehandeling, bepaald door middel van statische contacthoekmetingen (n=3).

Statische contacthoek [°]	
Au	68.3 ± 1.0
Au + O ₂ DBD plasma	32.2 ± 0.4
Au + O ₂ DBD plasma + DAMA	72.7 ± 2.6

Uit de resultaten, weergegeven in Tabel V.2.7 blijkt dat een DBD plasmabehandeling van het goudoppervlak aanleiding geeft tot een significante ($p < 0.05$) lagere contacthoek in vergelijking met niet voorbehandeld goud. Dit duidt op een hydrofieler oppervlak, wat kan toegeschreven worden aan het verwijderen van oppervlaktecontaminaties (cfr C-sigitaal van niet voorbehandeld goud in Tabel V.2.6). Na behandeling met het dopamine methacrylamide stijgt de contacthoek significant ($p < 0.05$), te wijten aan de hydrofobe methacrylamidefuncties die gebonden

zijn aan het oppervlak. In vergelijking met het goudsubstraat is de statische contacthoek significant ($p < 0.05$) gestegen, wat een stijging in hydrofiliciteit weergeeft (417, 467).

V.3. Fosforylcholine als een biomimetisch celmembraan.

Veelal kan men het falen in klinische applicaties te wijten aan trombose en stenose, toeschrijven aan een gebrek aan hemocompatibiliteit (482). De bloedcompatibiliteit is één van de meest essentiële eigenschappen voor een biomedisch materiaal. De trombose die geïnitieerd wordt door een materiaaloppervlak is de voornaamste hindernis voor het toepassen van medische materialen en artificiële organen in klinische toepassingen (483). Indien een vreemd materiaal wordt blootgesteld aan bloed zullen plasmaproteïnen snel absorberen op het materiaaloppervlak. Vervolgens zullen de bloedplaatjes absorberen op het fibrinogeen, gevolgd door de activering en aggregatie van de bloedplaatjes. Finaal zal er een trombose gevormd worden (484-485).

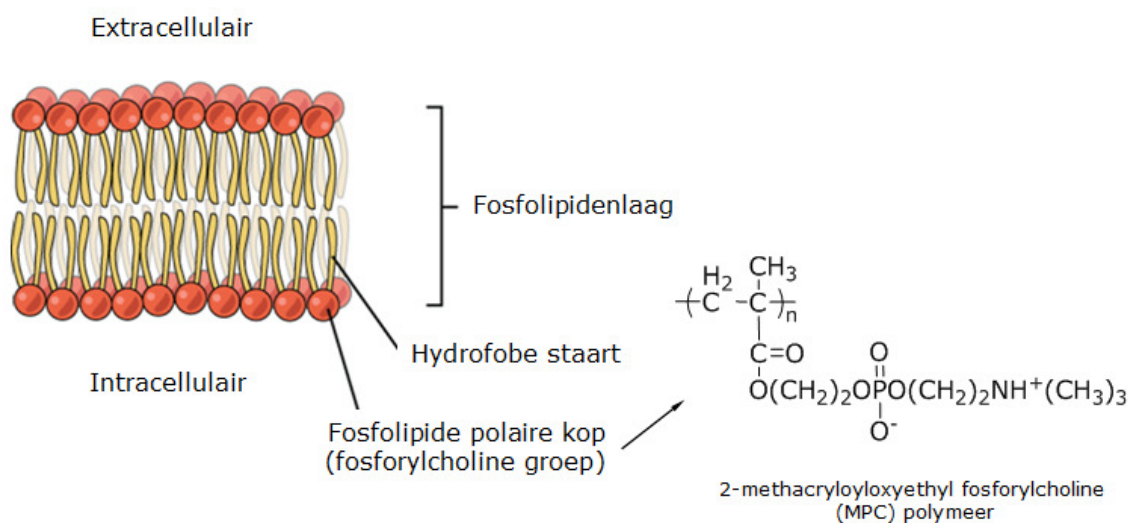
Fosfolipiden zijn de hoofdcomponenten van het celmembraan en zijn daardoor een interessante component in het biomedische veld. Fosforylcholine is een bioactieve molecule die aanwezig is op het eind van het lipide en op het externe oppervlak van het celmembraan. Het biomembraan mimetisch oppervlak, gebaseerd op fosforylcholine bevattende polymeren hebben een uitstekende weerstand voor aspecifieke proteïne adsorptie en celadhesie (486-491).

De antitrombose eigenschappen en de uitstekende biocompatibiliteit van zwitterionische moleculen kan men toeschrijven aan de synergie van positieve en negatieve ladingen, dewelke een gunstige invloed hebben op de proteïnen (492). De natuurlijke conformatie van de proteïnen wordt behouden wanneer ze contact maken met het materiaaloppervlak (493-494). Fosforylcholine groepen kunnen een hydrofiele laag vormen analoog aan het buitenste oppervlak van het celmembraan (495). In vergelijking met niet gecoate oppervlakken, zullen deze biomimetische fosforylcholine oppervlakken resistent zijn tegen bloedplaatjesadhesie en zullen ze de kans op trombosevorming verminderen (496-497). In recente jaren zijn er veel benaderingen voor het immobiliseren van PC gebaseerde componenten op polymeeroppervlakken, zoals: mengen, fysisch coaten en chemisch

enten (498-499). Voor de methoden die gebruik maken van mengen of fysisch coaten kunnen de PC componenten uitloggen in een korte tijdsperiode wanneer deze in contact komen met bloed. Indien de PC groepen covalent gebonden worden op een materiaaloppervlak door chemisch enten, kunnen deze moeilijker verwijderd worden. Alsook zal de chemische enting enkel plaatsvinden aan het oppervlak waardoor de buigzaamheden van een materiaal niet beïnvloed worden. Hoewel de ontwikkeling van PC gebaseerde componenten geïnspireerd is door de oppervlaktestructuur van een celmembran, zullen de bewegingsmogelijkheden gelimiteerd zijn indien deze direct gekoppeld zijn op een oppervlak. De PC groepen creëren een specifieke biomimetische oppervlak (500-503).

V.3.1. Synthese en karakterisatie van het 2-methacryloyloxyethyl fosforylcholine.

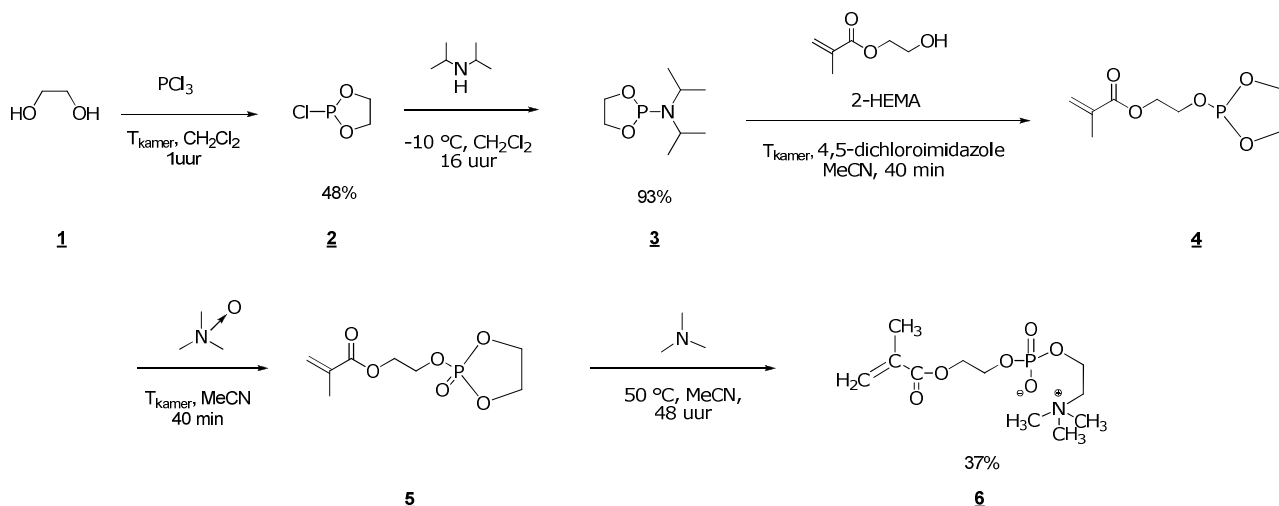
In dit werk wordt een polymeriseerbaar derivaat gesynthetiseerd van fosforylcholine; het 2-(methacryloyloxy)ethyl fosforylcholine (zie Figuur V.3.1). Dit derivaat heeft als doel om materialen te ontwikkelen met een verhoogde biomimetische structuur dewelke men covalent kan immobiliseren op een oppervlak, zodoende men een biomimetische structuur van een celmembran op een oppervlak kan introduceren.



Figuur V.3.1 – Schematische weergave van een celmembran en het MPC polymeer (504).

Polymeren die bestaan uit MPC en hydrofobe alkylmethacrylaatstructuren zijn veelvuldig benut in vele biomedische toepassingen als coatingmateriaal voor het verhogen van de hemocompatibiliteit (487, 505). Het geobserveerde mechanisme van de bloedcompatibiliteit inzake MPC polymeren is in essentie een functie van de fosforylcholinegroepen aanwezig aan de interfase tussen het polymeer en de biologische omgeving. Mathieu et al (491) ontwikkelden een acrylaatpolymeer met een fosforylcholine groep en onderzochten de reorganisaties van de fosforylcholine groepen in polaire en apolaire omgevingen. In polaire omgeving zal de fosforylcholinegroep zodanig georiënteerd zijn dat de interfaciale energie minimaal is waardoor het celadhesieresistente eigenschappen bezit. Van de fosforylcholine gemodificeerde oppervlakken wordt verwacht dat ze een bloedplaatjesadhesie kunnen weerstaan. Deze PC gemodificeerde materialen kunnen toegepast worden voor materialen die in contact komen met bloed (499). Poly(MPC) kan een grote hoeveelheid aan vrij water opslaan rond de keten, dewelke specifieke proteïne adsorptie kan weerstaan en dit zal ook voorzien in de stabilisatie van biomoleculen zoals enzymen en proteïnen, zelfs wanneer de biomoleculen geadsorbeerd worden op het oppervlak (506-508).

Het 2-(methacryloyloxy)ethyl fosforylcholine wordt bereid door gebruikt te maken van de fosforamidietroute (zie Figuur V.3.2) en is gebaseerd op de synthese van Ishihara et al (497). Deze synthesesweg maakt gebruik van het 4,5-dichloorimidazool als een zure katalysator voor het bereiden van de fosfiet ester uit het overeenstemmende fosforamidiet en het gebruik van trimethylamine N-oxide als een oxidant voor de conversie van de fosfiet ester naar het overeenstemmende fosfaat.



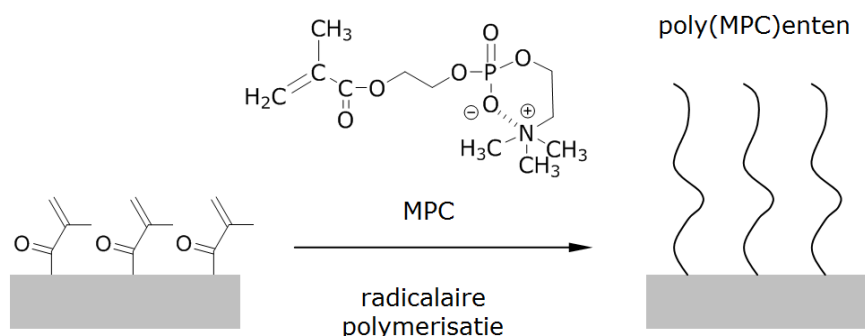
Figuur V.3.2 - Syntheseweg van 2-(methacryloyloxy)ethyl fosforylcholine.

Het ethyleenchlorofosfiet **2** wordt bekomen door een reactie van fosfortrichloride met glycol. Het ethyleen diisopropylfosforamidiet **3** wordt vervolgens bekomen door het toevoegen van diisopropylamine aan **2**. De cyclische ethyleen fosfietester **3** ondergaat vervolgens reactie met het 2-hydroxyethyl methacrylaat in acetonitrille met het gebruik van 4,5-dichloroimidazool als katalysator. Na het koelen van het mengsel en het filteren van de diisopropyl ammonium dichlorimidazole zout dat uitprecipiteert verkrijgt men het cyclische fosfiet **4**. Dit wordt in een volgende stap geoxideerd tot het overeenstemmende fosfaat **5**, waarna met reactie met het trimethylamine het fosforylcholine zal gevormd worden. De tussenproducten **4** en **5** worden niet opgezuiverd voor gebruik in de volgende stap. Het trimethylamine *N*-oxide zal het cyclische fosfiet **4** oxideren en tegelijkertijd zal het trimethylamine optreden als reagens voor het openen van het cyclische fosfaat, hetgeen resulteert in het eindproduct in één stap.

V.3.2. Immobilisatie van MPC via copolymerisatie met een monolaag van DAMA.

Het algemene gebrek van reactieve functionele groepen op oppervlakken maakt een modificatie van deze materialen moeilijk. In dit werk is er een eenvoudige en algemene methode ontwikkeld voor oppervlaktemodificatie door het combineren van de voordelen van dopamine en een conventionele radicalaire polymerisatie. In een eerste stap zal het

dopamine methacrylamide onderworpen worden aan een oxidatieve polymerisatie in basische omstandigheden om het substraat te coaten. Enten van poly(MPC) kunnen in een daaropvolgende stap bekomen worden door een radicalaire polymerisatiereactie zoals schematisch weergegeven in Figuur V.3.3. In een eerste stap zal door dipcoaten een monolaag dopamine methacrylamide afgezet worden op een goudoppervlak. Hierdoor zullen koolstof-koolstof dubbele bindingen gevormd worden op het oppervlak en kan dit vervolgens gecopolymeriseerd worden met verschillende monomeren door een radicalaire polymerisatie. In een volgende stap wordt een 0.1 M oplossing van MPC samen met een oplossing van Irgacure 2959 op het oppervlak gebracht en blootgesteld aan UV licht gedurende 30 min.



Figuur V.3.3 – Poly(MPC) enten door radicalaire vernetting van het geïmmobiliseerde dopamine methacrylamide monolaag op goud.

Aanwijzingen voor een efficiënt doorgevoerde reactie kan men terugvinden in de element samenstelling van het XPS spectrum (Tabel V.3.1).

Tabel V.3.1 – Elementsamenstelling van het covalent geïmmobiliseerde poly(MPC) met een monolaag van DAMA op het goudoppervlak, bepaald door middel van XPS (n=1).

Element	Praktisch [%]	Theoretisch [%]
C [%]	65.8	57.9
O [%]	20.5	31.6
P [%]	2.3	5.3

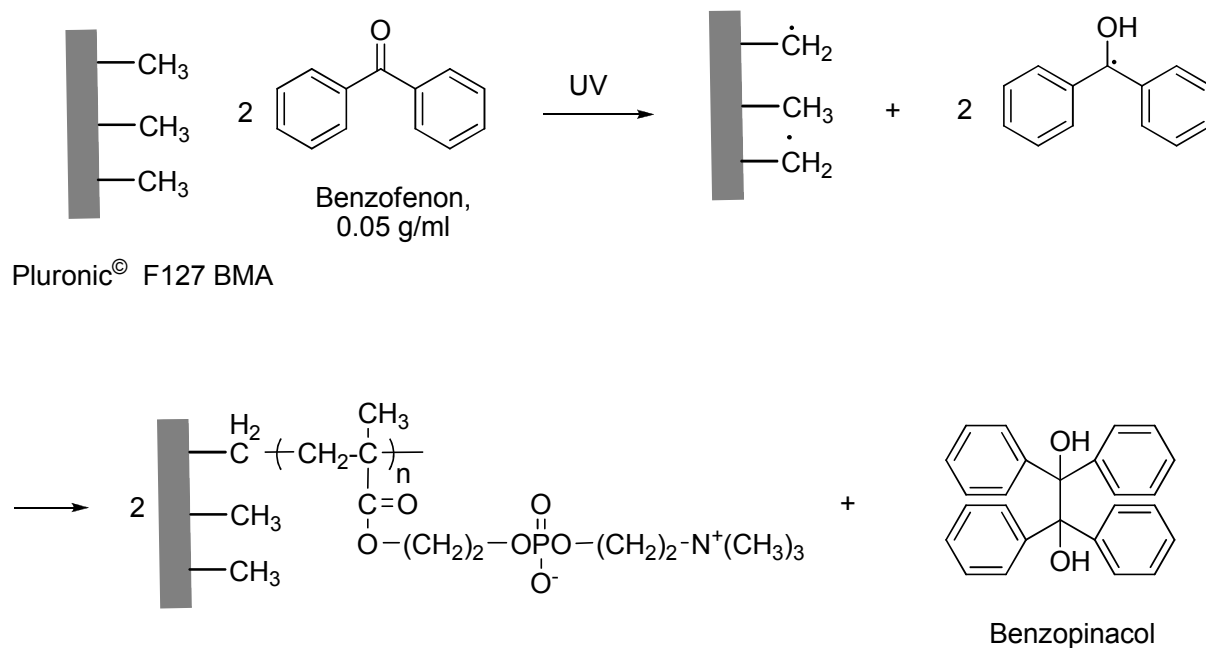
N [%]	3.8	5.3
Si [%]	2.4	-
B [%]	0.1	-

Een gelijkaardige immobilisatiestrategie werd toegepast door Wu et al (509) voor het succesvol copolymeriseren van polyvinylchloride op een vinyl gefunctionaliseerd goudoppervlak.

V.3.3. Immobilisatie van MPC via een entpolymerisatie met benzofenon.

In deze paragraaf beschrijven we een eenvoudige en efficiënte methode voor een MPC 'grafting from' polymerisatiereactie op Pluronic® F127 BMA. Hiertoe worden gespincoate glasplaatjes met poly(Pluronic® F127 BMA) onderworpen aan een absorptie met benzofenon. Na een droogstap wordt het staal ondergedompeld in een waterige oplossing van MPC. Door het polaire karakter van de oplossing zal het geabsorbeerde benzofenon niet heroplossen in de waterige fase. Hierdoor kan er een 'grafting from' polymerisatie uitgevoerd worden door het benzofenon die zich bevindt aan het oppervlak. Vervolgens aanleggen van UV licht zal aanleiding geven tot het vormen van radicalen in de hydrogel laag, hetgeen zorgt voor een radicalaire polymerisatie van het MPC met de vrije dubbele bindingen in de poly(Pluronic® F127 BMA) laag.

In Figuur V.3.4 wordt op een schematische manier de entpolymerisatie weergegeven van MPC op een Pluronic® F127 BMA oppervlak. De entlocatie is beperkt tot het polymeeroppervlak. Het geadsorbeerde benzofenon op het substraat vertoont een fotochemische reactie. Het benzofenon wordt geëxciteerd naar een triplet toestand dewelke een waterstofatoom zal onttrekken van de α -methyl groep van het substraat en zal polymeerradicalen ontwikkelen die de mogelijkheid hebben om een entpolymerisatie te initiëren van de monomeren. Het aangeslagen benzofenon zal uiteindelijk zich omzetten in benzopinacol.



Figuur V.3.4 - MPC entopolymerisatie op een poly(Pluronic® F127 BMA) oppervlak met benzofenon als UV foto-initiator.

Aanwijzingen voor een efficiënte reactie kan men terugvinden in de oppervlaktecomposities bekomen via XPS analyses, opgenomen in Tabel V.3.2.

Tabel V.3.2 - Elementsamenstelling van het poly(MPC) oppervlak door midden van XPS.

Element	Praktisch [%]	Theoretisch [%]
C [%]	63.2	57.9
O [%]	23.5	31.6
P [%]	4.8	5.3
N [%]	4.2	5.3
Si [%]	3.0	-
B [%]	0.1	-

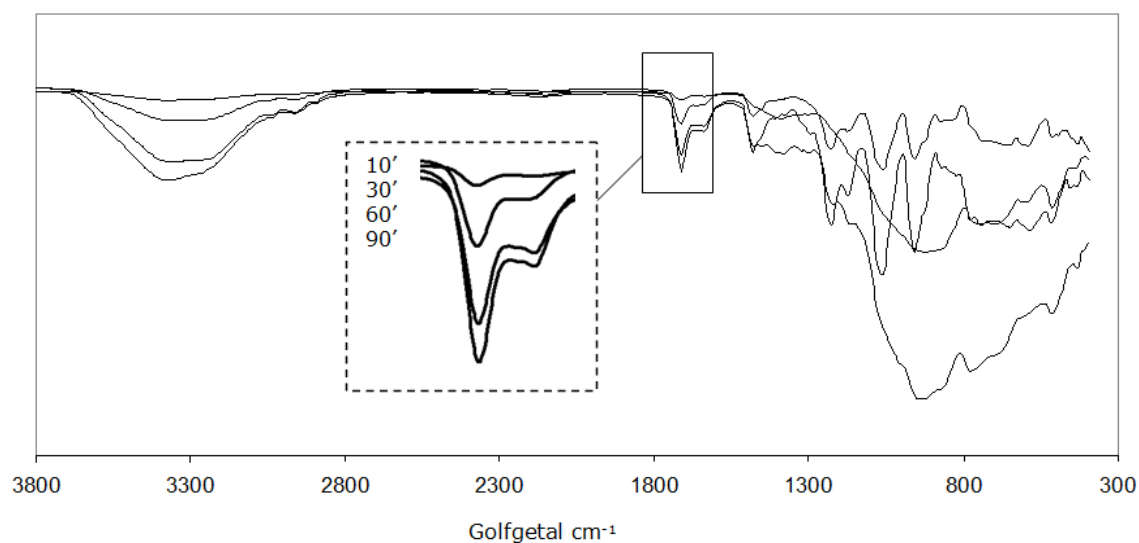
Goda et al (510) paste een gelijkaardige vrije radicalaire polymerisatie toe met benzofenon voor het enten van MPC op een polydimethylsiloxaan oppervlak. De bekomen

XPS analyses voor de indentificatie van de C, O, N en P elementen stemt overeen, wat duidt op een efficiënt doorgevoerde functionalisatie.

Moro et al (511-514) ontwikkelden een artificieel orthopedisch gewricht door een oppervlaktebehandeling met poly(MPC) polymeren met een oppervlakte geïnitieerde entpolymerisatie. De onderdrukking van ontstekingsreacties door omliggend weefsel is toegeschreven aan de biologische inertheid van MPC-polymeren. Een gewrichtsvervanging met behulp van poly(MPC) gemodificeerde oppervlakken kunnen de levensduur van een prothese verlengen en voorkomen zowel mechanische slijtage als biologische reacties.

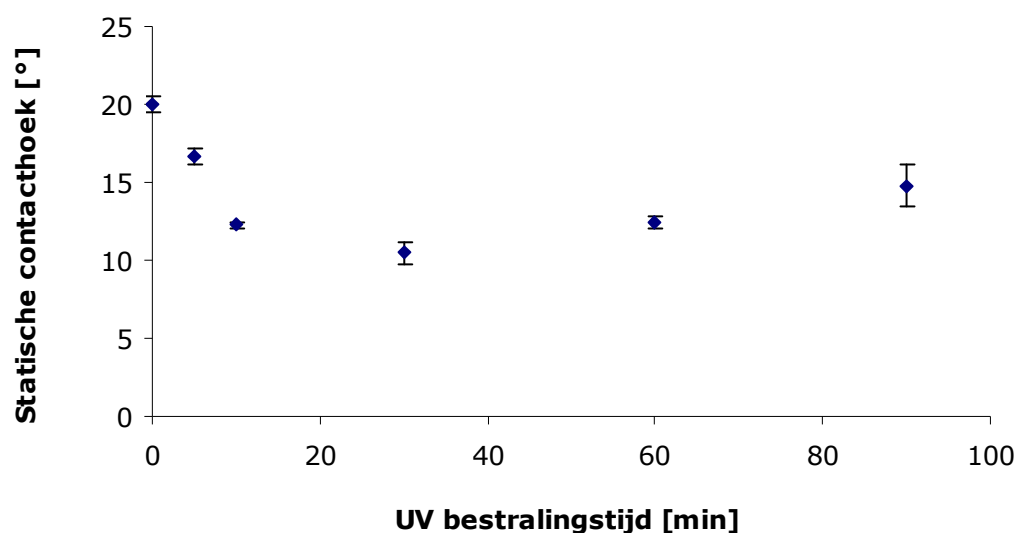
V.3.3.1. Parameters die het entproces van MPC op poly(Pluronic® F127 BMA) substraten beïnvloeden.

In deze paragraaf wordt onderzocht welke parameters het enten van MPC op poly(Pluronic® F127 BMA) substraten beïnvloedt. Hierbij wordt met name gekeken naar de UV bestralingsduur en de aangewende benzofenon concentratie. Uit variatie van de UV bestralingduur (van 10 tot 90 minuten) blijkt aan de hand van de bekomen ATR-FTIR spectra (Figuur V.3.5) dat de intensiteit van de karakteristieke IR pieken (i.e. 1712 en 3425 cm^{-1} , afkomstig van de carbonylfunctie) toeneemt bij een stijgende UV bestralingsduur. Deze gegevens vormen een eerste aanwijzing dat het enten van MPC bij langere UV bestralingstijden aanleiding geeft tot een grotere hoeveelheid geënt poly(MPC).

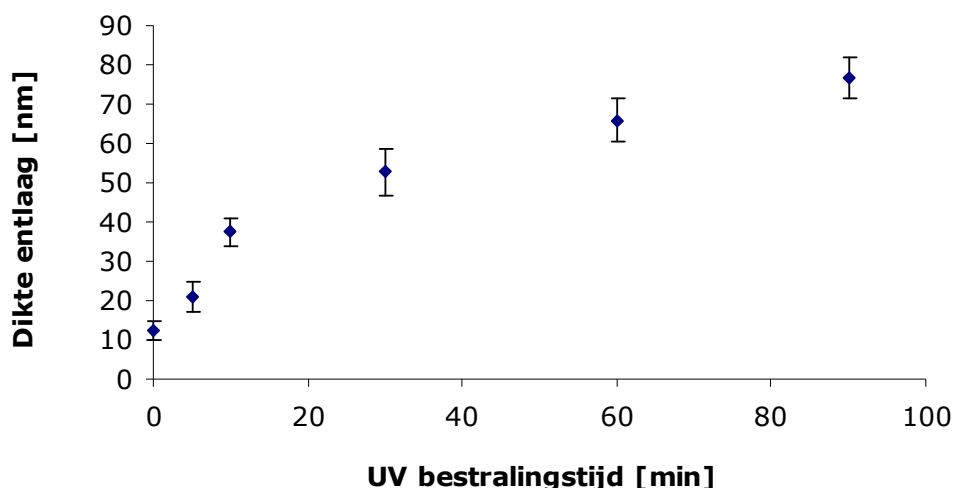


Figuur V.3.5 – Effect van de UV bestralingstijd op het benzofenon geïnitieerd enten van MPC op poly(Pluronic® F127 BMA) substraten bestudeerd door middel van ATR-FTIR spectroscopie. De UV bestralingstijd wordt gevarieerd van 10 tot 90 minuten.

Het entproces wordt verder bestudeerd aan de hand van statische contacthoekmetingen (SCA) en ellipsometrie. In onderstaande figuren wordt de relatie weergegeven tussen de UV bestralingsduur in functie van de statische contacthoek (Figuur V.3.6) en de dikte van de entlaag (Figuur V.3.7).



Figuur V.3.6 - Statische contacthoekwaarden voor enten van MPC op poly(Pluronic® F127 BMA) substraten (n=3).



Figuur V.3.7 – Dikte van de entlaag van MPC op poly(Pluronic® F127 BMA) substraten bepaalt door ellipsometrie in functie van verschillende UV belichtingstijden (n=3).

De statische contacthoeken dalen met een toenemende UV bestralingstijd met een maximum in polariteit (overeenkomend met de laagste contacthoek met water) bij 30 minuten. Dit kan men toeschrijven aan een toenemende entlaag dikte van het hydrofiele poly(MPC), de ellipsometrie data bevestigen dit resultaat. De contacthoeken bereiken een constante bij een UV bestralingstijd bij 100 minuten voor een MPC entpolymerisatie, zoals bevestigd door Tatsuro et al (515).

Dit is te wijten aan de vrije radicalaire entpolymerisatie die niet in staat is om de lengte van de ketens te controleren door de UV bestralingstijd (510). Het losmaken van poly(MPC) op de poly(Pluronic® F127 BMA) hydrogel wordt onderzocht, hierbij wordt poly(MPC) niet gedetecteerd nadat het gemodificeerde oppervlak gewassen werd in ethanol gedurende één uur.

Een volgende parameter die wordt bestudeerd is de invloed van de benzofenon concentratie. Hierbij worden verschillende gespinoate stalen behandeld met vijf verschillende benzofenon concentraties gedurende 1 min (Tabel V.3.3). In deze studie wordt de dip-coating procedure van benzofenon uitgevoerd met concentraties gaande van 1.0 tot 10.0 g/L in aceton.

Tabel V.3.3 – Bepaling van de hoeveelheid geadsorbeerde benzofenon in functie van de toegepaste concentratie benzofenon (n=3).

Concentratie benzofenon	Benzofenon geadsorbeerd per plaat
[g/L]	[mol]
10,0	2,35E-07 ± 2,50E-08
7,5	1,31E-07 ± 2,20E-08
5,0	1,27E-07 ± 2,70E-08
2,5	1,25E-07 ± 2,47E-08
1,0	9,80E-08 ± 1,10E-08

Men kan concluderen dat de hoeveelheid aan geadsorbeerd benzofenon significant ($p < 0.05$) toeneemt met stijgende benzofenon concentratie.

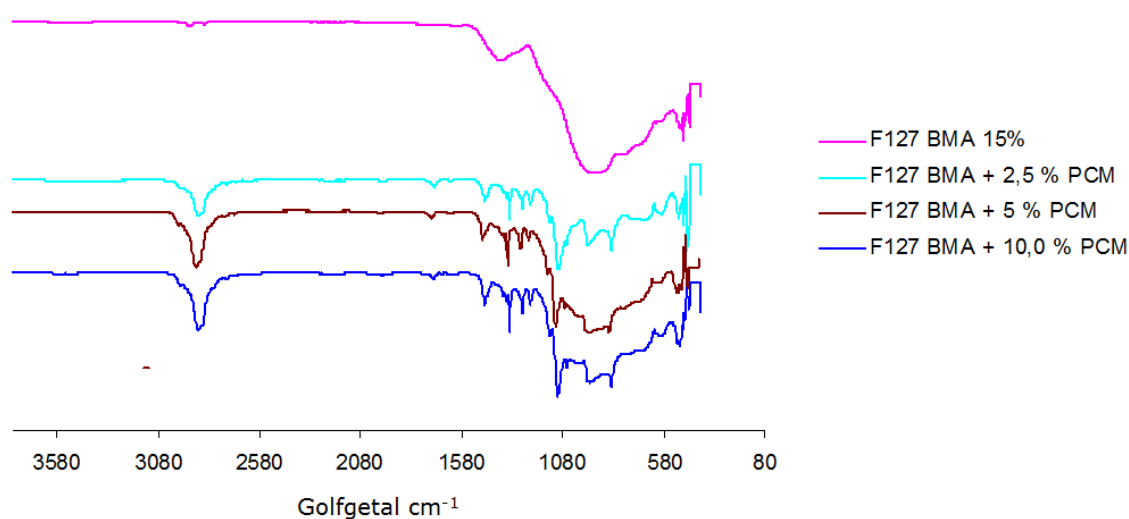
V.3.4. Copolymerisatie van MPC met Pluronic® F127 BMA.

Een aanvullende methode om het MPC covalent te immobiliseren is door een copolymerisatie met Pluronic® F127 BMA. Hierbij worden verschillende concentraties aan MPC (2.5, 5.0 en 10% MPC) toegevoegd aan een 15% oplossing van PCM in water, samen met Irgacure 2959. De verschillende oplossingen worden gespincoat op glasplaatjes en vervolgens vernet met behulp van UV licht, gewassen en gedroogd onder vacuüm. Karakterisatie van het oppervlak wordt uitgevoerd met SCA-metingen volgens de 'sessile drop' methode (LY-Water). Uit Tabel V.3.4 kan men afleiden dat random, radicalaire copolymeren van Pluronic® F127 BMA met PCM resulteren in hydrofielere oppervlakken ten opzichte van Pluronic® F127 BMA.

Tabel V.3.4 - Statische contacthoeken van Pluronic® F127 met en zonder PCM coating (n=3).

	SCA [°]
F127 BMA	63.7 ± 4.1
F127 BMA + 10% PCM	57.8 ± 3.8
F127 BMA + 5.0% PCM	60.3 ± 4.2
F127 BMA + 2.5% PCM	61.4 ± 2.5

Van de betreffende stalen wordt er vervolgens een FTIR-spectrum opgenomen (zie Figuur V.3.8). Men kan een toenemende piek waarnemen in het alkaangebied (2850-3000 cm⁻¹) bij een toenemende stijging van de PCM concentratie.



Figuur V.3.8 - FTIR spectra van Pluronic® F127 BMA en Poly(MPC-random- Pluronic® F127 BMA) in verschillende concentraties.

Tatsuro et al (515) ontwikkelden een sensoroppervlak door een random copolymerisatie van MPC met *n*-butyl methacrylaat (BMA) en *p*-nitrofenyloxycarbonyl-poly(ethyleen glycol)-methacrylaat (MEONP) [poly(MPC-co-BMA-co-MEONP), PMBN]. PMBN zal een PC monolaag vormen op een amine gefunctionaliseerd 'self-assembled monolayer' (SAM) door een covalente binding tussen de actieve ester in MEONP en de amine groep. De

hydrofobe BMA eenheden zullen optreden als een moleculaire spacer voor de PC groepen en zal de hydrofiele PC groepen oriënteren naar de vloeibare fase.

V.4. Preliminaire *in vitro* biologische evaluatie.

V.4.1. Inleiding.

Pluronic® F127 wordt gebruikt in gecontroleerde geneesmiddelaafgifte en celencapsulatie toepassingen (516-520). Het injecteerbare en hydrofiele karakter van hydrogelen maken hen geschikte kandidaten voor weefselregeneratie (521-522). Hydrogelen kunnen niet enkel cellen encapsuleren, maar kunnen ook de celviabiliteit en het fenotype in stand houden. Ivana et al (523) kwamen tot de conclusie dat Pluronic® F127 een veelbelovende draagstructuur is voor de encapsulatie van DPSCs (dentale pulp stamcellen) met een hoge stamcelviabiliteit en proliferatie.

Monroy et al (524) en Saim et al (525) toonden aan dat hydrogelen succesvol kunnen toegepast worden voor de encapsulatie van chondrocyten en dat deze de *in vivo* kraakbeenvorming bevorderen. Meer recent werk door Lee en Park (526) toont aan dat Pluronic® F127 geblend kan worden met ECM componenten voor het verbeteren van de celadhesie en ECM productie. Veel gebruikte methoden voor het combineren van een hydrogel met extracellulaire matrix (ECM) componenten zijn een chemische vernetting en zelfassemblage (527-528).

Pluronic® F127 zal collageenvorming stimuleren, hetgeen resulteert in een verbeterde angiogenese (529-530). Hierdoor is dit type van hydrogel een veelbelovende kandidaat voor de encapsulatie van MSC's voor de regeneratie van zwak gevasculariseerd weefsel zoals pezen, epitheelweefsel en beenweefsel (531-535).

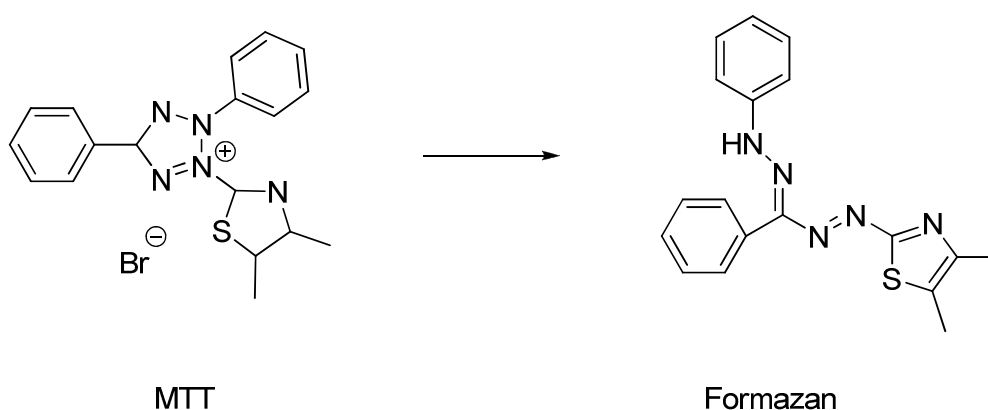
Brunet-Maheu et al (533) hebben aangetoond dat Pluronic® F127 leidt tot een optimale celverdeling. De FDA heeft het gebruik van Pluronic® F127 in mensen goedgekeurd (533).

V.4.2. Bepalen van de celviabiliteit via calceïne AM/PI en MTT.

Twee testen worden gebruikt om de celviabiliteit te bepalen: de calceïne AM/PI test voor visualisatie via fluorescentiemicroscopie en de MTT test voor kwantificatie van het aantal viabele cellen via spectrofotometrie.

Calceïne AM is een niet-fluorescerend celpermeabel substraat dat onder invloed van esterases, aanwezig in viabele cellen, wordt omgezet tot het niet celpermeabel groen fluorescerend calceïne. Deze stof wordt gebruikt in combinatie met propidiumiodide, dat intercaleert met DNA van dode cellen resulterend in een rode fluorescentie.

Met de MTT test wordt de celviabiliteit kwantitatief gemeten. Deze test (536-538) is gebaseerd op een colorimetrische methode waarbij een tetrazoliumzout wordt gebruikt, waarmee het overleven van cellen wordt gekarakteriseerd door het meten van de enzym activiteit binnen de cel. Het geel gekleurde tetrazoliumzout (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromide) wordt omgezet naar een purper gekleurd, onoplosbaar formazanprecipitaat (Figuur V.4.1) door de mitochondriale enzymen van metabolisch actieve cellen. Het formazan wordt vervolgens opgelost in 2-propanol en de concentratie wordt bepaald door spectrofotometrische detectie bij 570 nm. De hoeveelheid formazan is doorgaans proportioneel aan het aantal metabolisch actieve cellen.



Figuur V.4.1 - Omzetting van het geel gekleurde MTT zout tot paars gekleurde formazankristallen door mitochondriale enzymen van metabolisch actieve cellen.

De celviabiliteit van de verschillende producten wordt geëvalueerd aan de hand van drie verschillende types cellen: Hep G2, MC3T3 en HFF. Het doel is om de gemodificeerde gel te gebruiken als een substraat voor de immobilisatie van de cellen.

De cellen secreten diverse belangrijke plasmaproteïnen zoals: albumine, alpha-2-macroglobuline, alpha-1 antitrypsine, transferrine en plasminogeen (537). Ze worden succesvol gekweekt in grootschalige cultivatiesystemen. Hep G2 is een humane leverkankercellijn en is afgeleid van het leverweefsel van een 15-jarige Amerikaanse adolescente jongen met een goed gedifferentieerd hepatocellulair carcinoom. De MC3T3 cellen hebben de capaciteit om te differentiëren in osteoblasten en osteocyten en kunnen gecalcificeerd botweefsel genereren *in vitro*. Minerale afzet is geïdentificeerd als hydroxyapatiet. De 'Human foreskin fibroblasts' worden geïsoleerd uit neonatale voorhuid.

V.4.3. Impact van de opgeloste Pluronic® derivaten op de cytotoxiciteit.

Het effect van de verschillende Pluronic® derivaten op de MC3T3 celviabiliteit is weergegeven in Tabel V.4.1 en Tabel V.4.2. Verdunningsreeksen van 15, 12, 9, 3 en 0% (w/w) worden uitgevoerd met titratie. Hierbij worden cellen in suspensie (2.1×10^5 cellen/ml/well) opgemengd met de hydrogel. De celviabiliteit wordt gemeten na 4 (Tabel V.4.1) en 24 uur (Tabel V.4.2) incubatie via een MTT test en uitgedrukt (%) ten opzichte van een controlecultuur.

Tabel V.4.1 - MC3T3 celviabiliteiten voor verschillende oplossingen van de Pluronic® derivaten na 4 uur (n=3).

Celviabiliteiten [%]					
	Gewichts % (w/w)				
	15	12	9	6	3
Diol	109.0 ± 15	115.0 ± 5	93.0 ± 14	82.6 ± 17	111.5 ± 22
Bismethacrylaat	115.2 ± 5	134.6 ± 30	112.4 ± 3	104.1 ± 6	100.7 ± 8
Bisacrylaat	9.5 ± 28	12.0 ± 5	47.3 ± 3	86.0 ± 2	112.3 ± 30
Bisacrylamide	106.4 ± 12	99.7 ± 21	91.1 ± 20	85.3 ± 5	81.0 ± 5
bisthioacetaat	86.4 ± 7	70.6 ± 2	68.5 ± 20	62.3 ± 16	68.0 ± 9

Tabel V.4.2 - MC3T3 celviabiliteiten voor verschillende oplossingen van de Pluronic® derivaten na 24 uur (n=3).

Celviabiliteiten [%]					
	Gewichts % (w/w)				
	15	12	9	6	3
Diol	165.0 ± 11	176.2 ± 6	133.3 ± 2	117.5 ± 14	116.5 ± 12
Bismethacrylaat	102.1 ± 8	115.2 ± 14	99.4 ± 12	97.5 ± 4	113.8 ± 11
Bisacrylaat	10.0 ± 22	9.6 ± 16	9.7 ± 2	10.8 ± 16	20.9 ± 24
Bisacrylamide	19.6 ± 28	82.0 ± 10	122.2 ± 3	77.7 ± 25	92.8 ± 13
bisthioacetaat	91.1 ± 14	83.6 ± 22	85.3 ± 10	77.2 ± 4	84.7 ± 20

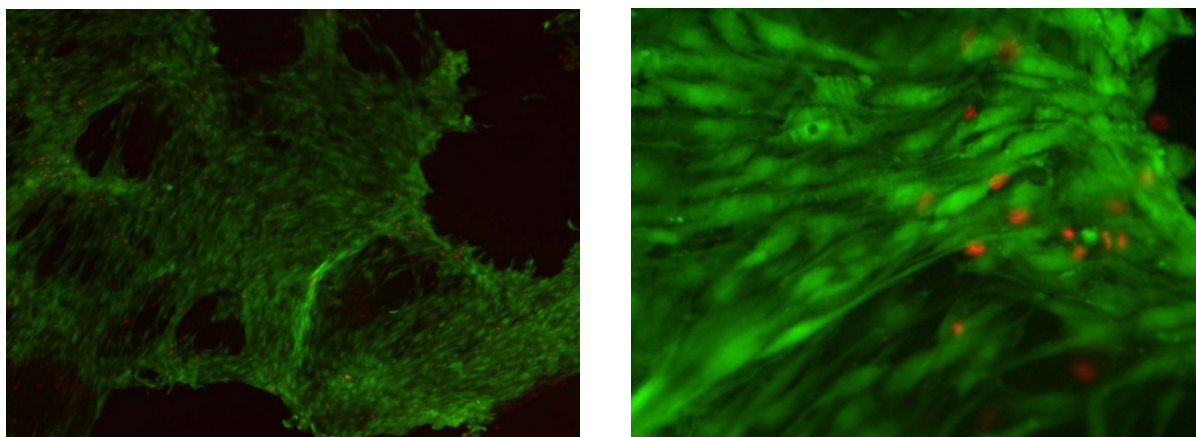
Er kan geen cytotoxisch effect waargenomen worden bij het bismethacrylaatderivaat na 4 uur voor alle geteste concentraties. Deze tijd zal voldoende blijken om de cellen te verwerken via de bioplotter technologie. Dezelfde viabiliteitstrend zien we voor het bisthioacetaat en het bisacrylamide derivaat, met uitzondering van laatstgenoemde voor een 15% (w/w) na 24 uur. De viabiliteit van het diol is significant ($p < 0.05$) gestegen na 24 uur ten opzichte van alle derivaten en voor alle concentraties en bevindt zich boven de 100%, dit kan men toeschrijven aan celproliferatie. De bekomen resultaten liggen in lijn met de waarden in het werk van Lippens et al (539) voor een depsipeptidederivaat

van Pluronic® F127 (Ala-L) met muisfibroblasten en epitheelcellen afkomstig uit het netvlies. Alsook met het werk van Khattak et al (540), waarbij de toxiciteit van Pluronic® F127 op HepG2 cellen werd getest. Bijkomende bevestiging vinden we in publicaties van humane endotheelcellen op Pluronic® F127 derivaten met een cyclische RGD peptide (arginine-glycine-asparaginezuur), waarbij er geen verschillen in cytotoxiciteit kan waargenomen worden ten opzichte van de niet gemodificeerde Pluronic® (541).

Het bismethacrylaat en het bisacrylamide tonen overeenkomstige viabiliteiten met de niet gemodificeerde Pluronic® na 4 uur. Echter dient men op te merken dat voor het bisacrylamiden de cytotoxiciteit na 24 uur voor een 15 gewichts% fors daalt. De bisacrylaatderivaten vertonen significant ($p < 0.05$) lage viabiliteiten voor alle concentraties zowel na 4 als 24 uur. Verklaringen voor de structuur - cytotoxiciteitsrelatie werd onderzocht door Lawrence et al (542) en Bass et al (543) voor 18 acrylaat en methacrylaat bevattende biomaterialen. Hieruit blijkt dat alle geteste acrylaten cytotoxischer zijn dan het overeenstemmende methacrylaatderivaat. Dillingham et al (544) kwam tot dezelfde conclusies met behulp van kwantitatieve hemolysetesten op acrylaten en methacrylaten met een bepaling van de intrinsieke hemolytische activiteit en LD₅₀. Dit ligt in lijn met de bekomen waarden. Het dient hierbij vermeld te worden dat de concentratie van de netwerkprecursor na chemische vernetting zeer laag zal zijn en beperkt is tot de uitlogbare fractie.

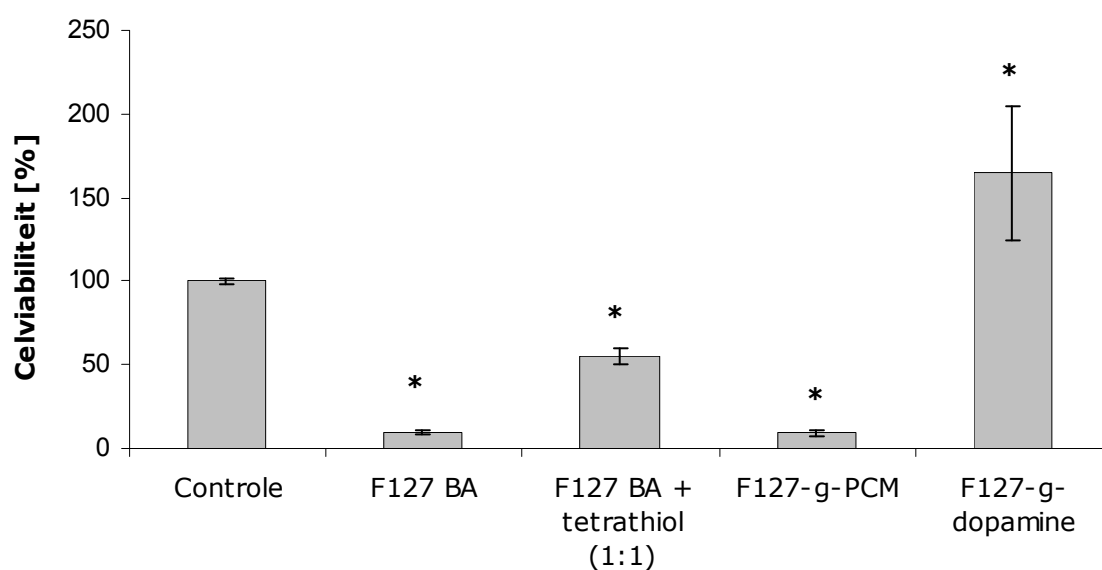
V.4.4. Celviabiliteit in contact met Pluronic® hydrogelen.

HFF cellen (40 000 cellen/24 well) worden op hydrogels uitgezaaid. De stalen worden geanalyseerd na 7 dagen via calceïne AM/PI fluorescentie, zie Figuur V.4.2.



Figuur V.4.2 – Fluorescentie microscopie van Pluronic® F127 BA - tetrathiol (links: 4x vergroting, rechts: 20x vergroting).

De celviabiliteiten voor de celadhesietesten zijn uitgezet in Figuur V.4.3 voor 4 verschillende Pluronic® derivaten. Alle Pluronic® derivaten verschillen significant ($p < 0.05$) van de controle.

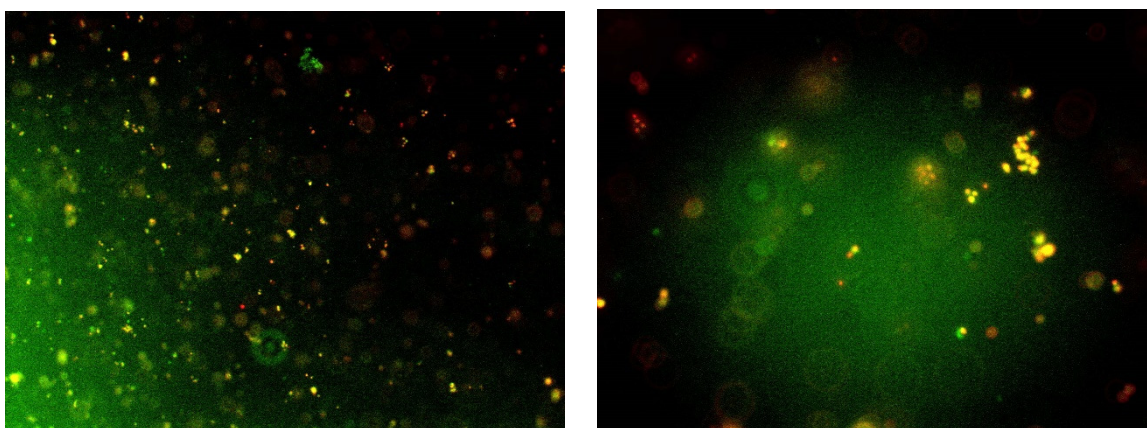


Figuur V.4.3 – HFF celviabiliteit na 7 dagen cultivatie op hydrogelen met verschillende Pluronic® derivaten (n=3).

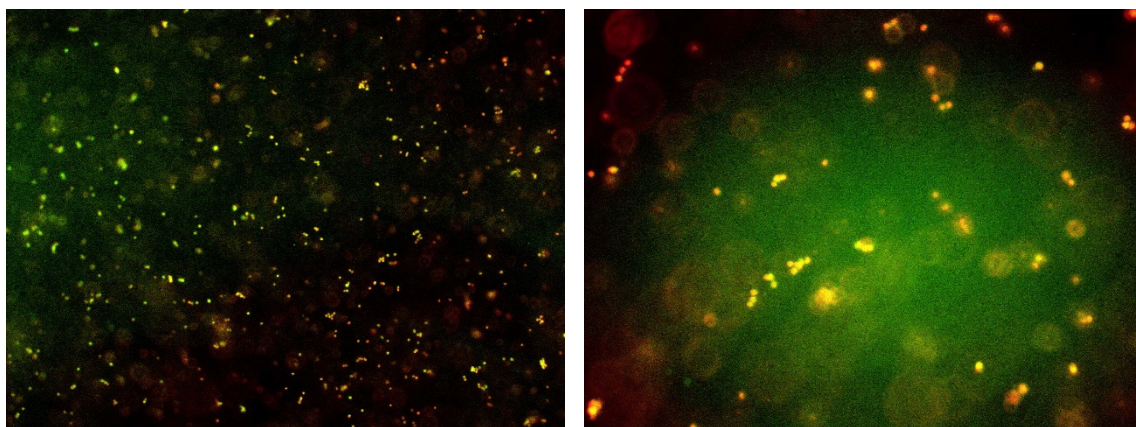
Uit Figuur V.4.3 kan men besluiten dat F127 BA + tetrathiol en F127-g-dopamine de hoogste celviabiliteiten hebben. F127 BA en F127-g-PCM, zijn bijzonder laag.

V.4.5. Celviabiliteit van ingekapselde cellen in Pluronic® hydrogelen.

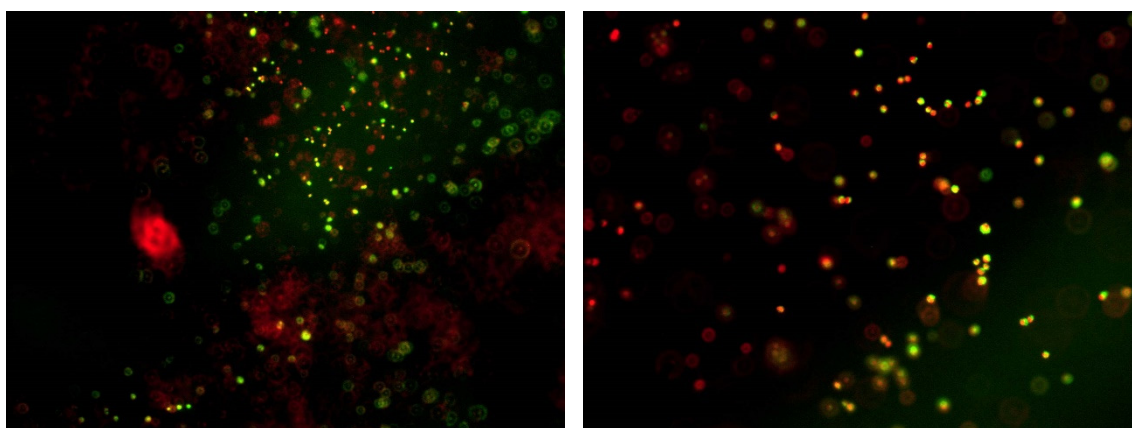
In Figuur V.4.4 is de viabiliteit van de Hep G2 cellen weergegeven voor een vernetting van Pluronic® BMA 20% (w/w) met 2 mol% Irgacure 2959 met een enkelzijdige UV bestraling. Met een calceïne kleuring worden de levende cellen weergegeven (groen), met propidium iodide de dode cellen (rood). Eveneens zijn er oranje gekleurde cellen aanwezig (dubbele kleuring). Waarschijnlijk kan men dit toeschrijven aan een aantasting van de membraanintegriteit. In Figuur V.4.5 zijn gelijkaardige microscoopbeelden weergegeven met MC3T3 cellen, die een opmerkelijke lagere viabiliteit vertonen. In een laatste test, weergegeven in Figuur V.4.6 wordt een Pluronic® BA in een 20 gewichts% (w/w) vernet met een 2.0 mol% Irgacure 2959 onder 30 min eenzijdige bestraling in combinatie met MC3T3 cellen. De roodkleurige cellen duiden op een lage viabiliteit.



Figuur V.4.4 - HepG2 cellen ($1,5 \cdot 10^6$ / ml) in Pluronic® BMA 20% (w/w), vernet met 2.0 mol% Irgacure 2959 onder 30 min UV bestraling (enkelzijdig, links: 4x vergroting, rechts: 20x vergroting).



Figuur V.4.5 - MC3T3 cellen ($1,5 \cdot 10^6$ / ml) in Pluronic® BMA 20% (w/w), vernet met 2.0 mol% Irgacure 2959 onder 30 min UV bestraling (enkelzijdig, links: 4x vergroting, rechts: 20x vergroting).

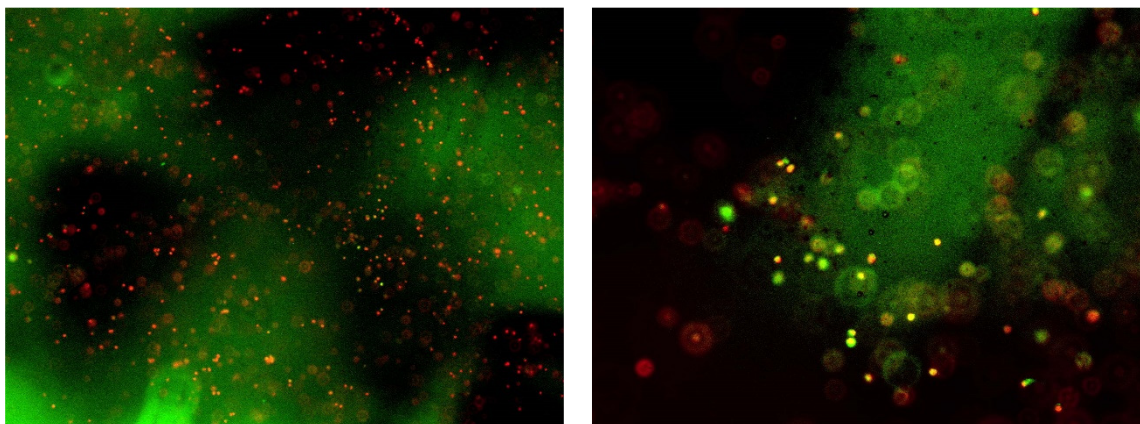


Figuur V.4.6 - MC3T3 cellen ($1,5 \cdot 10^6$ / ml) in Pluronic® BA 20% (w/w), vernet met 2.0 mol% Irgacure 2959 onder 30 min UV bestraling (enkelzijdig, links: 4x vergroting, rechts: 20x vergroting).

Publicaties rond het gebruik van Pluronic® hydrogelen voor de encapsulatie van cellen zijn beperkt. Lee et al (545) onderzochten het effect van encapsulatie van NIH/3T3 cellen in een 13% (g/g) di-acrylaat Pluronic® F127 gel op de celviabiliteit. Onmiddellijk na vernetten met UV licht zijn er geen cytotoxische effecten waar te nemen op de geëncapsuleerde cellen. Khattak et al (540) onderzochten de encapsulatie van HepG2 levercellen in een 20% (g/g) Pluronic® F127 oplossing zonder het toevoegen van een voedingsbodem. Deze groep rapporteerde een celviabiliteit van 52% na 1 dag encapsulatie. Deze percentages dalen naar 15% gedurende de volgende 3-5 dagen.

V.4.6. Effect van de bisacrylaat-thiol vernetting op de celrespons.

Bij deze experimenten wordt de hydrogel emulsie van Pluronic® F127 BA en het tetrathiol opgemengd met MC3T3 cellen. Vernetting gaat door zonder toevoeging van foto-initiator en zonder het aanleggen van UV licht. Opnieuw zien we een lage cel viabiliteit, toe te schrijven aan de aantasting van het celmembraan.



Figuur V.4.7 - MC3T3 cellen ($1,5 \cdot 10^6$ / ml) in Pluronic® BA 20% (w/w) met tetrathiol (links: 4x vergroting, rechts: 20x vergroting).

V.4.6.1. Membraanstabiliserende additieven

Poly(ethyleen oxide) bevattende polymeren kunnen de biologische membraanstructuur aantasten. Concentraties van 5% (g/g) en meer zullen in het gebied van de gehydrateerde lipide bilaag veranderingen teweeg brengen en membraanfusie veroorzaken (546). Verschillende studies tonen aan dat lage concentraties van F127 zullen adsorberen op het celoppervlak en het transport bevorderen van componenten die normaal ondoordringbaar zijn voor een intact celmembraan (547-549).

In verschillende publicaties zijn Pluronics® gerapporteerd als bevorderend voor de penetratie van medicijnen doorheen biologische membranen (celmembranen (550-551) en bloed-hersenbarrière (552-553)).

Er kunnen additieven toegevoegd worden voor het verbeteren van de celviabiliteit. Enkele mogelijkheden zijn biocompatibele membraanstabilisatoren voor het behouden van de celviabiliteit en het bevorderen van celgroei in Pluronic® F127 geëncapsuleerde systemen. Hydrocortison is een glucocorticosteroïde dat het metabolisme zal beïnvloeden van proteïnen, vetten en koolhydraten (554). In celcultuur zal hydrocortison celaanhechting en proliferatie bevorderen en kan deze celdifferentiatie induceren (554). Glucose treedt op als een mechanische stabilisator in alginaat-chitosan capsules (555). Glycerol is bekend als osmotische stabilisator. Zo zullen bijvoorbeeld bacteriën levensvatbaar blijven in silicagel wanneer de encapsulatie uitgevoerd wordt in de aanwezigheid van glycerol (556). Khattak et al (540) voegden succesvol hydrocortison toe als membraanstabiliserend additief voor een verbeterde celviabiliteit in encapsulatie toepassingen.

V.5. Conclusies.

Hydrofiele oppervlakken vertonen een lage adsorptie van serum proteïnen en een lage interactie met cellen. Om hieraan tegemoet te komen werd er een biomembraan mimetische structuur gesynthetiseerd: het 2-methacryloyloxyethyl fosforylcholine (MPC). Dopamine kan men aanwenden als een eenvoudige éénstaps oppervlaktecoating. De dopamine/poly(dopamine) laag die hiermee ontstaat laat toe om verschillende secundaire reacties te introduceren. Een methacrylamide derivaat van dopamine (DAMA) werd succesvol gesynthetiseerd. In een eerste stap werd door dipcoaten een laag dopamine methacrylamide afgezet op het oppervlak. Hierdoor werden koolstof-koolstof dubbele bindingen gevormd en werd dit vervolgens gecopolymeriseerd met MPC. Een alternatieve manier voor het immobiliseren van MPC op een poly(Pluronic® F127 BMA) oppervlak werd bekomen via een entpolymerisatie (grafting-from) met benzofenon. Een langere UV bestralingsduur en een hogere hoeveelheid geadsorbeerd benzofenon geeft aanleiding tot een hogere concentratie aan geënt poly(MPC). Alsook kan Pluronic® F127 door een vrije radicalaire polymerisatie random gecopolymeriseerd worden met MPC.

In een laatste deel werden de bekomen hydrogelen preliminair *in vitro* biologisch geëvalueerd. Er werd geconcludeerd dat een chemische modificatie van Pluronic® F127 leidt tot een significant verschil in cytotoxiciteit na 24 uur voor MC3T3 cellen, met uitzondering van het bisacrylaatderivaat (lage celviabiliteiten). Uit de celviabiliteitsstudies is gebleken dat Pluronic® de biologische membraanstructuur aantasten. Hierdoor is het gebruik van membraan stabiliserende additieven aangewezen.

VI Productie van 3D draagstructuren via de bioplotter technologie.

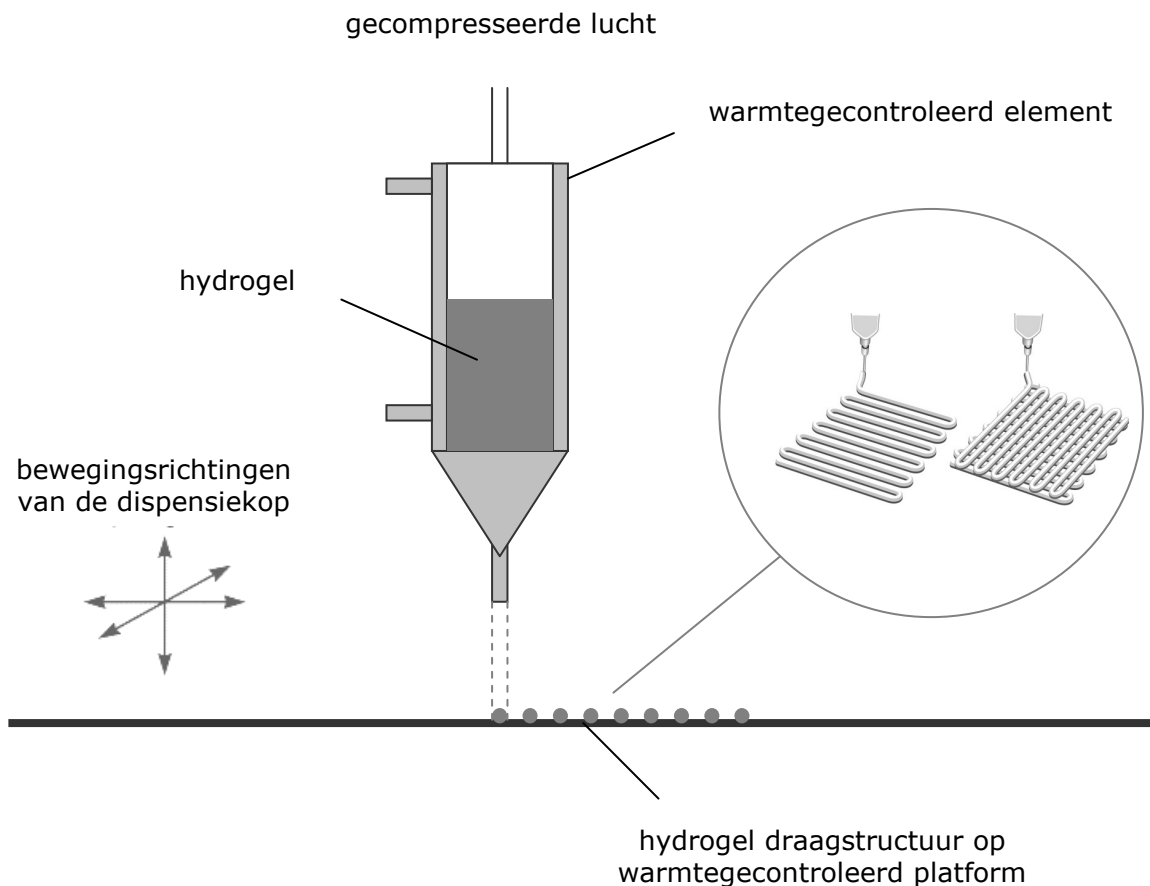
VI.1. Inleiding.

In het laatste deel van de thesis wordt een inleiding genomen voor het op punt stellen van de plotparameters voor een Pluronic® F127 BMA oplossing, gebruik makende van de bioplotter technologie. We stellen op een empirische manier de plotbaarheid van Pluronic® F127 BMA op punt. Dit met als doel om reproduceerbare draagstructuren te bekomen met perfecte interconnectieve, poreuze en vernette eigenschappen. Dit koppelen we aan een theoretisch onderbouwd procesmodel.

Uit dit hoofdstuk is er een review gepubliceerd (557) met als titel "A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering". Hierin worden verschillende rapid prototyping technieken beschreven voor het verwerken van hydrogelen. Speciale aandacht gaat naar de actuele trends en beperkingen. Elke techniek wordt bediscussieerd in functie van de aangewende hydrogel. Alsook is dit verschenen als een hoofdstuk in het boek 'Biologically Responsive Biomaterials for Tissue Engineering' (558), de bijdrage in de publicaties was voornamelijk het schrijven van de nozzle gebaseerde luiken.

VI.2. De bioplotter voor de verwerking van thermoresponsieve hydrogelen.

De bioplotter is een 'rapid prototyping' apparaat, uitgevonden in 2000 aan het Freiburg Materials Research Center in Duitsland. Het is hedendaags een commercieel beschikbaar plotsysteem dat toelaat om draagstructuren te creëren van materialen met een lage mechanische sterkte (98, 559). In Figuur VI.2.1 wordt schematisch het principe van de biplottertechniek voorgesteld.



Figuur VI.2.1 - Principe van de bioplottertechniek voor een thermoresponsieve hydrogel.

Het plotmateriaal (eventueel met cellen) wordt onder druk gedispenseerd uit een patroon. De nozzle kan hierbij in de x-, y- of z-richting bewegen met een standaard resolutie van 50 μm . De resolutie van het systeem hangt samen met de diameter van de naald die meestal tussen 200-300 μm bedraagt. Op die manier kan een 3D draagstructuur laag na laag op een gecontroleerde manier opgebouwd worden. De bioplotter is zo geconcepieerd dat hij in steriele omgeving gebruikt kan worden. Hierdoor is werken met levende cellen mogelijk. Er kunnen celculturen van de patiënt uitgezaaid worden, waardoor een autoloog implantaat wordt geproduceerd. Er werd aangetoond dat cellen de chemische en mechanische stress waaraan ze worden blootgesteld tijdens het plotproces overleven (560). Moroni et al (561) onderzochten de invloed van de draagstructuurarchitectuur op de dynamisch-mechanische eigenschappen. Het resultaat bevestigde dat de visco-elastische eigenschappen gemoduleerd kunnen worden door de

interne architectuur aan te passen. Hieruit blijkt dat de porositeit en fiber depositie/oriëntatie cruciale factoren zijn. Cellen en temperatuurgevoelige componenten zoals proteïnen en groeifactoren kunnen geïmplementeerd worden in het plotting proces (562-567). Pluronic[®] zijn reeds succesvol toegepast voor het genereren van draagstructuren in combinatie met hematopoëtische stamcellen (568), longweefsel (569) en epitheelcellen (570).

VI.2.1. Pluronic[®] F127 en derivaten als sacrificiële bioinkt.

Pluronic[®] F127 wordt gebruikt als bioinkt voor het genereren van sacrificiële structuren (571-572). Het bezit een goede plotbaarheid en de temperatuur-responsieve gelling is uitermate geschikt voor bioinkten (571, 573-578). Een belangrijk voordeel is de hoge resolutie van de geplotte draagstructuren. Struts van 150 µm (574) en 450 - 500 µm (579) zijn gerapporteerd. Fedorovich et al (574-575) maakten gebruik van een fotopolymeriseerbaar Pluronic[®] F127 derivaat voor het verbeteren van de mechanische eigenschappen. Het onderzoekswerk toont aan dat de viabiliteit van multipotente stromale cellen van een geit tot 52% kan verbeteren na het toevoegen van hydrocortison in de bioinkt (574). Smith et al (579) toonden aan dat 60% van menselijke primaire fibroblasten de condities overleeft tijdens het plotproces. Muller et al (578) gebruikten een combinatie van Pluronic[®] bisacrylaat en Pluronic[®] F127 met hyaluronzuur methacrylaat als een bioinkt voor nanogestructureerde holten voor het bioplotten van chondrocyten. De celviabiliteit werd geschat op 88% op dag 7, in vergelijking met een zuivere Pluronic[®] F127 bismethacrylaat bioinkt met 56,3% cel-levensvatbaarheid (578). Gioffredi et al (564) gebruikten Pluronic[®] F127 (25% (g/v)) als bioinkt met encapsulatie van cellen (Balb/3T3 fibroblasten) voor het genereren van draagstructuren met een 0°/90° patroon, de celviabiliteit werd behouden tijdens het printen. Melchels et al (580) plotten een methacrylaat derivaat van Pluronic[®] F127 in combinatie met een methacryloyl derivaat van gelatine. Deze bioinkt creëert een cytocompatibele omgeving voor cellen.

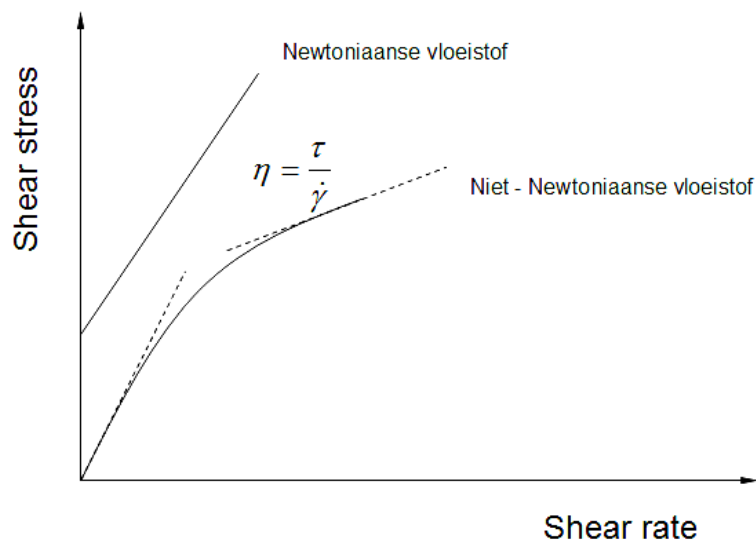
VI.3. Procesmodellen voor de 3D productie van Pluronic® F127 BMA draagstructuren.

VI.3.1. Pluronics® als niet-Newtoniaanse vloeistof.

Bij de depositie van hydrogelen is het belangrijk dat we bij het opstellen van een procesmodel de polymeerreologie begrijpen. De polymeerviscositeit is hierbij één van de belangrijkste parameters (581). De viscositeit is gelijk aan de shear stress over de shear rate, zoals weergegeven in vergelijking VI.1.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{[VI.1]}$$

Waarbij τ de shear stress is, η de viscositeit en $\dot{\gamma}$ de shear rate. De eenheden van viscositeit kan voorgesteld worden als dynes.s/cm², hetgeen gekend staat als een Poise. Voor een Newtoniaanse vloeistof is de viscositeit een constante en is deze direct proportioneel aan de shear rate. De helling is hierbij een constante. Anderzijds zal de viscositeit van een niet-Newtoniaans vloeistof een functie zijn van de shear rate. Een typische shear stress-shear rate relatie voor Newtoniaanse en niet-Newtoniaanse vloeistoffen is weergegeven in Figuur VI.3.1.



Figuur VI.3.1 - Viscositeitsgedrag voor Newtoniaanse en niet-Newtoniaanse vloeistoffen.

Voor niet-Newtoniaanse polymerooplossingen zal de viscositeit een functie zijn van de temperatuur, druk en afschuifspanning die toegepast wordt. Algemeen zal de viscositeit stijgen met een toenemende druk, met een daling van de temperatuur en met een daling van de afschuifspanning. Pluronic® F127 BMA oplossingen vertonen een thermoresponsief gedrag en zullen in tegenstelling tot andere materialen een viscositeitstoename vertonen binnen een stijgend temperatuursinterval. Alsook zal de viscositeit toenemen met een stijgend moleculair gewicht en met de moleculaire architectuur. Het reologisch gedrag van stervormige Pluronics® ten opzichte van hun lineaire analogen is bijzonder. Ze hebben kleinere hydrodynamische radii en lagere interne viscositeiten dan de lineaire analogen van hetzelfde moleculaire gewicht (582-583). De interne viscositeit neemt toe met toenemende functionaliteit en met het moleculaire gewicht van de zijketens (584). Dit zorgt ervoor dat de viscositeit enkel zal afhangen van het moleculair gewicht van de armen.

VI.3.2. Procesmodel voor de strutdiameter.

De microkleppen deposeren een Pluronic® oplossing en vormen cilindrische struts. Deze worden georiënteerd om laagsgewijs een draagstructuur te vormen. De geometrie en de

diameter van de struts zijn een functie van volgende procesparameters: de drukgradiënt, de viscositeit van de vloeistof, de nozzlediameter en de snelheid van de nozzlebeweging (depositiesnelheid) zoals weergegeven in vergelijking VI.21.

$$D = f\left(v, R, n, \eta, \gamma, \frac{\partial P}{\partial Z}\right) \quad [\text{VI.21}]$$

Waarbij D de strutdiameter is en direct proportioneel gerelateerd is aan het debiet van de depositie. Bij een constant debiet zal D indirect geproportioneerd zijn aan de nozzle snelheid. Daarom kan D uitgedrukt worden in functie van het debiet Q en de depositiesnelheid v:

$$D = f(Q, v) = f\left(Q\left(R, n, \eta_0, \gamma, \frac{\partial P}{\partial Z}\right), v\right) \quad [\text{VI.22}]$$

Voor een gegeven debiet Q en een gegeven tijd t, zal het geëxtrudeerde volume uit de nozzle V kunnen berekend worden als:

$$V = Qt \quad [\text{VI.23}]$$

Met t de tijd dat er geëxtrudeerd wordt. Het geëxtrudeerde volume V van een cilindrische strut met een uniforme diameter D met een lengte L kan geschreven worden als:

$$V = \pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 L \quad [\text{VI.24}]$$

In de veronderstelling dat:

$$v = \frac{4Q}{\pi D^2} \quad [\text{VI.25}]$$

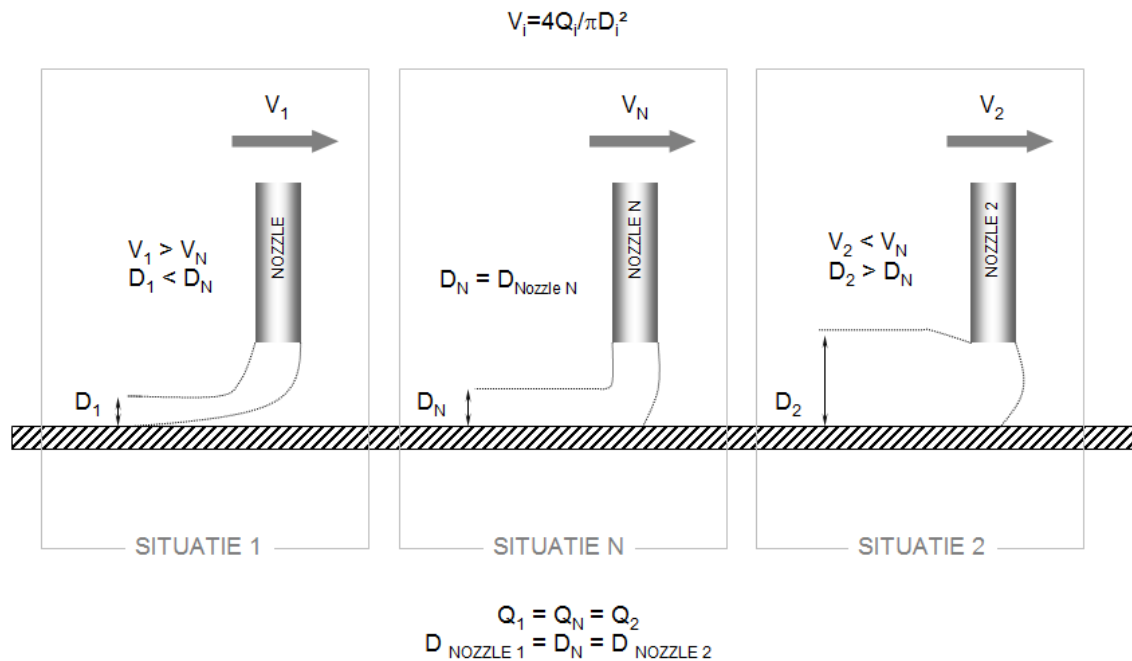
Daardoor zal vergelijking VI.25 expliciet uitgedrukt worden als:

$$D = \sqrt{\frac{4Q}{\pi v}} = 2 \sqrt{\frac{\left(\frac{n}{3n+1}\right) \gamma_0^{\frac{n-1}{n}} \left(\frac{\frac{\partial P}{\partial z}}{2\eta_0}\right)^{\frac{1}{n}} R^{\frac{3n+1}{n}}}{v}} \quad [\text{VI.26}]$$

Vergelijking VI.26 kan gebruikt worden voor het voorspellen van de diameter van een strut indien de procesparameters gegeven zijn. Voor een gegeven constant debiet is de gefabriceerde strut diameter omgekeerd proportioneel aan de snelheid van de nozzle. Voor een gegeven nozzle en een gegeven debiet vinden we dat voor een nozzlesnelheid v_N bij dewelke de gefabriceerde strut diameter D gelijk is aan de nozzle radius R en de nozzlediameter D_N :

$$v_N = \frac{4Q}{\pi D_N^2} \quad [\text{VI.27}]$$

Men kan de hypothese voorop stellen dat indien de nozzlesnelheid v groter is dan v_N , de geproduceerde strutdiameter gewoonlijk kleiner is dan de nozzlediameter en als de nozzlesnelheid kleiner is dan v_N , de geproduceerde strutdiameter gewoonlijk groter is dan de nozzlediameter. Deze verwantschap wordt geïllustreerd in Figuur VI.3.2. De strutdiameter is een functie van de nozzlesnelheid, de binnenste straal van de nozzle, de krachtwetindex van de vloeistof, de gelimiteerde viscositeit bij lage shear rate, shear rate en de drukgradiënt zoals weergegeven in vergelijking VI.7.



Figuur VI.3.2 - Drie situaties voor de strutdiameter, situatie1 ($V_1 > V_N$), situatië N (V_N) en situatie 2 ($V_2 < V_N$).

De strutproductie is een proces dat bij voorkeur uitgevoerd wordt bij v_N in plaats van het gebruik te maken van andere snelheden. De reden hiervoor is dat er geen spanning of compressie wordt toegepast op de struts tijdens de depositie van een Pluronic® oplossing door de nozzle.

VI.3.3. Procesmodel voor het debiet.

In deze paragraaf wordt een analytisch model voor het voorspellen van het debiet van een niet-Newtoniaanse Pluronic® oplossing voorgesteld. Het model is gebaseerd op de vergelijking van Poiseuille (581) en is geïmplementeerd op de beschouwde procesparameters. Als we de krachten beschouwen die inwerken op een element van een vloeistof in een capillair voor een Newtoniaanse vloeistof kunnen we de shear stress als volgt schrijven:

$$\tau = \frac{r}{2} \left(\frac{\partial P}{\partial z} \right) \quad [\text{VI.2}]$$

Waarbij r de straal is van het capillair, P de druk en z de richting in de capillaire aslijn. Als we veronderstellen dat de drukval uniform is, dan kunnen we zeggen dat voor een drukval P over een lengte L de shear stress gegeven wordt door:

$$\tau = \frac{rP}{2L} \quad [\text{VI.3}]$$

en met de gekende shear stress als:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} = \eta \frac{\partial v}{\partial r} \quad [\text{VI.4}]$$

Waarbij v de snelheid is in de stroomrichting en r de afstand is van de buis-as.

$$\eta \frac{\partial v}{\partial r} = \frac{r}{2} \frac{\partial P}{\partial z} \quad [\text{VI.5}]$$

Integratie levert volgende op:

$$\int_0^v dv = \int_R^r \frac{1}{2\eta} \frac{dP}{dz} r dr \quad [\text{VI.6}]$$

Bij $r = 0$ en $v = v_0$ krijgen we:

$$v_0 = -\frac{1}{4\eta} \frac{dP}{dz} R^2 \quad [\text{VI.7}]$$

$$v = v_0 \left(1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right) \quad [\text{VI.8}]$$

Het volumetrische debiet kunnen we bepalen met:

$$Q = \int_0^R 2\pi r v dr = \int_0^R 2\pi r v_0 \left(1 - \left(\frac{r}{R} \right)^2 \right) dr = \frac{\pi}{r} v_0 R^2 \quad [\text{VI.9}]$$

Herschikken geeft:

$$Q = - \frac{\pi R^2}{8\eta L} \frac{dP}{dz} \quad [\text{VI.10}]$$

(volumetrisch debiet voor $n = 1$; Newtoniaans gedrag)

Hetgeen gekend staat als de vergelijking van Poiseuille. Het krachtwet model kan dus gewijzigd worden om te voldoen aan de opgenomen limitatie door het gebruikt te maken van vergelijking VI.11.

$$\eta = \eta_0 |\lambda_c \dot{\gamma}|^{n-1} \quad [\text{VI.11}]$$

Voor de niet-lineaire curve van de viscositeit in functie van de shear rate kan een algemeen model gebruikt worden, hetgeen gekend staat als de Carreau (581) vergelijking, zoals weergegeven in vergelijking VI.12.

$$\frac{\eta_a}{\eta_0} = \left[1 + (\lambda_c \dot{\gamma})^2 \right]^{(n-1)/2} \quad [\text{VI.12}]$$

Zoals reeds eerder aangetoond is η_0 de gelimiteerde viscositeit als lage shear rate en is de constante λ_c het punt bij welke shear verdunning optreedt. De stroom van niet

samendrukkende krachtwetvloeistof door een uniforme, circulaire doorsnede kan geanalyseerd worden door te starten van de kracht van balans, gegeven door:

$$\eta = \eta_0 \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_0} \right)^{n-1} = \eta_0 \left(\frac{\frac{\partial v}{\partial r}}{\dot{\gamma}_0} \right)^{n-1} \quad [\text{VI.13}]$$

En:

$$\frac{\partial v}{\partial r} = \frac{r}{2\eta_0 \left(\frac{\frac{\partial v}{\partial r}}{\dot{\gamma}_0} \right)^{n-1}} \frac{\partial P}{\partial z} \quad [\text{VI.14}]$$

Wat geeft:

$$\left(\frac{\partial v}{\partial r} \right)^n = \frac{r \dot{\gamma}_0^{n-1}}{2\eta_0} \frac{\partial P}{\partial z} \quad [\text{VI.15}]$$

en kan geïntegreerd worden tussen de limieten $v = v$ bij een straal r en $v = 0$ bij radius R en geeft:

$$v = \left(\frac{n}{n+1} \right) \dot{\gamma}_0^{\frac{n-1}{n}} \left(\frac{\frac{\partial P}{\partial z}}{2\eta_0} \right)^{\frac{1}{n}} \left(r^{\frac{n+1}{n}} - R^{\frac{n+1}{n}} \right) \quad [\text{VI.16}]$$

Bij $r = 0$, $v = v_0$

$$\nu_0 = \left(\frac{n}{n+1} \right) \gamma_0^{\frac{n-1}{n}} \left(\frac{\frac{\partial P}{\partial z}}{2\eta_0} \right)^{\frac{1}{n}} R^{\frac{n+1}{n}} \quad [\text{VI.17}]$$

Daardoor kan de snelheid bij elke straal uitgedrukt worden als:

$$\nu = \nu_0 \left(1 - \left(\frac{r}{R} \right)^{\frac{n+1}{n}} \right) \quad [\text{VI.18}]$$

Voor het bekomen van het debiet, de integraal in vergelijking VI.19 kan omgezet worden naar:

$$Q = \int_0^R 2\pi r \nu dr = \int_0^R 2\pi r \nu_0 \left(1 - \left(\frac{r}{R} \right)^{\frac{n+1}{n}} \right) dr \quad [\text{VI.19}]$$

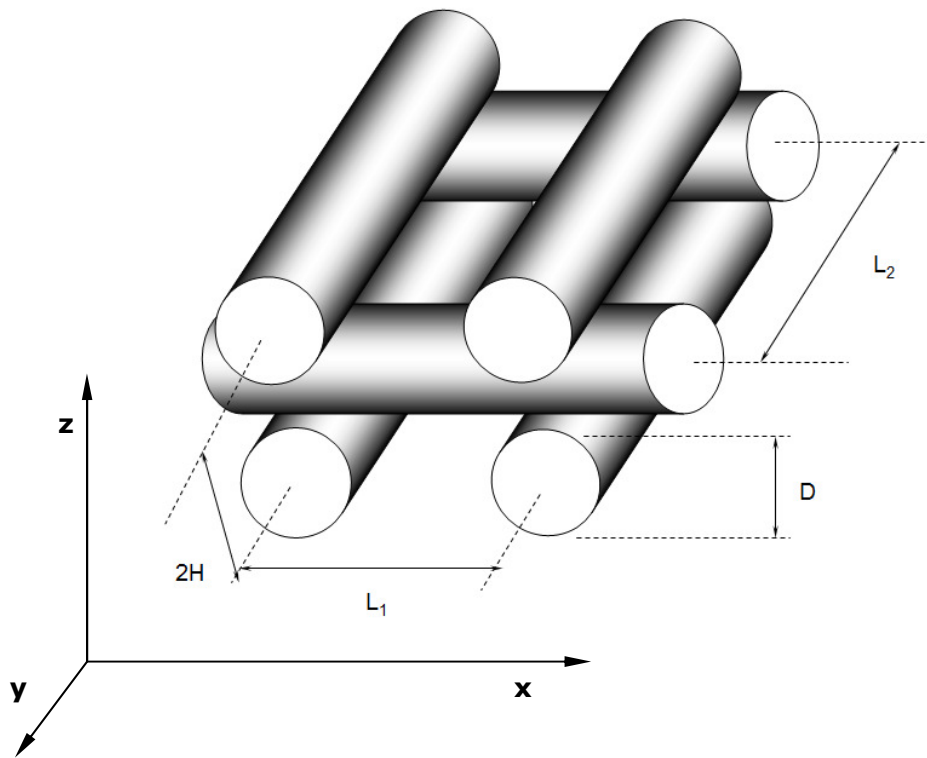
Hetgeen geeft:

$$Q = \left(\frac{n}{3n+1} \right) \pi \gamma_0^{\frac{n-1}{n}} \left(\frac{\frac{\partial P}{\partial z}}{2\eta_0} \right)^{\frac{1}{n}} R^{\frac{3n+1}{n}} \quad [\text{VI.20}]$$

Men kan zien dat, indien $n = 1$, vergelijking VI.20, vergelijking VI.10 wordt. De vergelijking is een veralgemeende Poiseuille vergelijking voor een niet-Newtoniaanse vloeistof. De krachtwet index n karakteriseert het nonlineaire gedrag van de stroom. Men kan zien dat de conventionele Poiseuille vergelijking VI.10 kan worden beschouwd als een speciale toepassing van vergelijking VI.10 bij $n = 1$ voor een lineaire stroom.

VI.3.4. Procesmodel voor porositeit.

Men omschrijft de porositeit van een object als de verhouding tussen het ruimtelijk volume en het totaal volume. In de situatie van de geproduceerde Pluronic® draagstructuur zal de geometrie en de architectuur van de draagstructuur een functie zijn van de porositeit zoals weergegeven in Figuur VI.3.3 en uitgedrukt in vergelijking VI.28.



Figuur VI.3.3 - Stapelen van verschillende lagen in een 90° oriëntatie van de Pluronic® draagstructuur.

$$Porositeit = f(L_1, L_2, H, D) \quad [VI.28]$$

$$= f\left\{L_1, L_2, H, D(v, R, n, \eta_0, \gamma, \frac{\partial P}{\partial Z})\right\}$$

Waarbij H de afstand is tussen 2 lagen in de Z richting, L_1 en L_2 de lengtes zijn van de celeenheden of de afstand tussen de struts in de x en y richting respectievelijk.

Het volume van een draagstructuur eenheidscel element V_{UC} kan men uitdrukken als:

$$V_{UC} = 2HL_1L_2 \quad [VI.29]$$

Volume van de strut in het element V_{UC} , V_s :

$$V_s = \frac{\pi D^2}{4} (L_1 + L_2) \quad [VI.30]$$

De porositeit van de draagstructuur is gekend als de ratio van het volume aan lege ruimte en het totale volume, hetgeen wordt uitgedrukt in vergelijking:

$$Porositeit = 1 - \frac{V_s}{V_{UC}} \quad [VI.31]$$

Substitueren van vergelijking VI.26 in vergelijking VI.31, kunnen we bewijzen dat de volgende relatie geldt:

$$Porositeit = 1 - \frac{\pi(L_1 + L_2) \left(\frac{n}{3n+1} \right) \gamma_0^{\frac{n-1}{n}} \left(\frac{\frac{\partial P}{\partial z}}{2\eta_0} \right)^{\frac{1}{n}} R^{\frac{3n+1}{n}}}{2vHL_1L_2} \quad [VI.32]$$

In het geval waar de afstand tussen de lagen H gelijk is aan de strutdiameter D, dan kan vergelijking VI.32 vereenvoudigd worden tot:

$$Porositeit = 1 - \frac{\pi D(L_1 + L_2)}{8L_1L_2} \quad [VI.33]$$

In het geval waar L_1 en L_2 gelijk zijn aan elkaar en gelijk aan de afstand tussen de aangrenzende struts d in de x en y richting voor elke laag, respectievelijk, dan kan vergelijking VI.33 geschreven worden als:

$$Porositeit = 1 - \frac{\pi D}{4d} \quad [VI.34]$$

Daardoor kan de porositeit in termen van procesparameters uitgedrukt worden als:

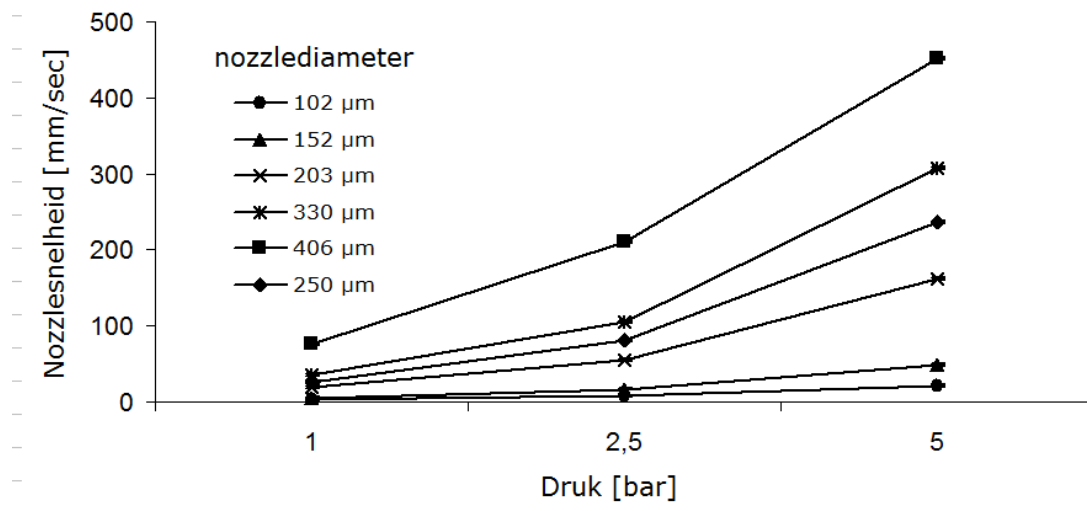
$$Porositeit = 1 - \frac{\pi}{2d} \sqrt{\frac{\left(\frac{n}{3n+1}\right) \gamma_0^{\frac{n-1}{n}} \left(\frac{\partial P}{\partial z}\right)^{\frac{1}{n}} R^{\frac{3n+1}{n}}}{\nu}} \quad [VI.35]$$

VI.4. Ontwerp en architectuur voor de 3D productie van Pluronic® F127 BMA draagstructuren.

VI.4.1. Controle van de strutdiameter.

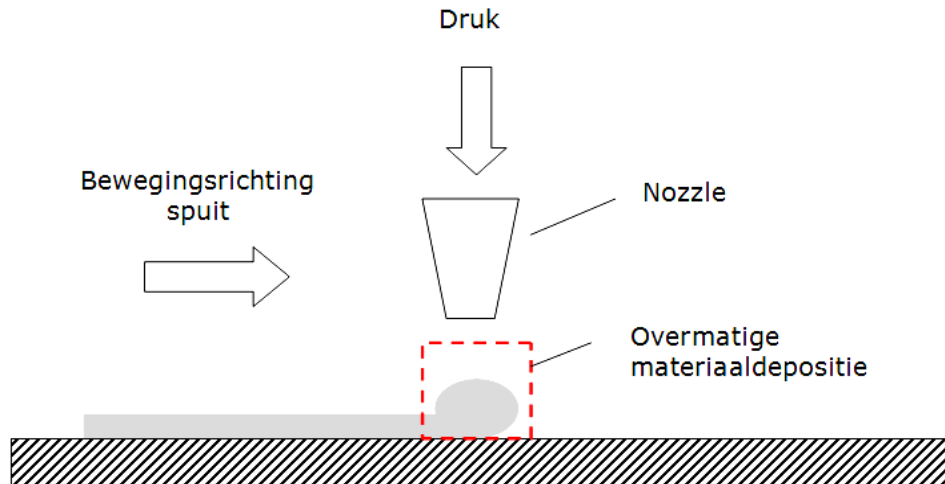
Zoals vermeld in vergelijking VI.27 kan de nozzlesnelheid v_N gebruikt worden voor de productie van bepaalde strutdiameters bij een bepaalde druk. Doordat we voorop stellen dat de strutdiameter gelijk dient te zijn aan de interne nozzlediameter, wordt de nozzlesnelheid bepaald voor verschillende drukken bij verschillende nozzlediameters, zie Figuur VI.4.1. De geconstrueerde structuren worden verwijderd en met een optische microscoop bestudeerd. De reologische eigenschappen van de hydrogeloplossing zijn grotendeels bepalend voor de in te stellen parameters. Een snellere plotting is mogelijk indien bij gelijke drukken wordt gewerkt met lagere viscositeiten. Het is belangrijk dat de

snelheid waarmee de oplossing wordt geëxtrudeerd afgestemd wordt op de snelheid waarmee de extrusiekop zich voortbeweegt in het XY-vlak.



Figuur VI.4.1 - Resultaten van nozzle-snelheid in functie van de druk voor een 30% (g/g) Pluronic® F127 BMA waterige oplossing bij 20°C door het gebruik te maken van een pneumatische klep, gebruik makende van de biplotter (n=3).

Indien de snelheid niet toeneemt of de druk van materiaaldepositie niet afneemt krijgt men aan de uiteinden van de struts een overmatige depositie van materiaal, grafisch kan men dit voorstellen als alle datapunten die boven de betreffende curve ligt in Figuur VI.4.1. Het fenomeen van overmatige materiaaldepositie is schematisch weergegeven in Figuur VI.4.2.

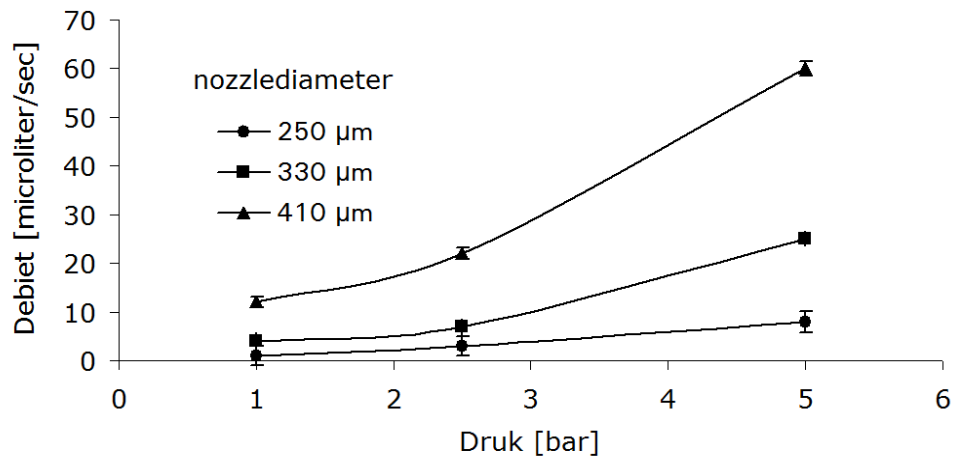


Figuur VI.4.2 - Overmatige materiaaldepositie aan het struteinde door een niet toenemende snelheid van de nozzle of door een niet afnemende druk.

In de volgende experimenten maakt men gebruik van de ideale strutdiameter, dit betekent dat een nozzle aangewend wordt bij zijn ideale druk en snelheid, zodoende de geplote strutdiameter gelijk is aan de nozzlediameter.

VI.4.2. Controle van het debiet.

Zoals men kan afleiden uit vergelijking VI.20 zal het debiet voor een niet-Newtoniaanse vloeistof gecontroleerd worden door zijn drukgradiënt dP/dZ bij een gegeven biplotteropstelling. De drukgradiënt is een unieke waarde voor elk depositiesysteem en is een functie van de nozzlediamter, druk en de interne geometrie dat het plotmateriaal doorloopt doorheen het kleppensysteem. Voor het bepalen van het debiet bij een welgegeven druk van de pneumatische klep bij de biplotter, maakt men gebruik van een Pluronic® F127 BMA concentratie van 30% (g/g). De resultaten voor de verschillende nozzlediameters zijn weergegeven in Figuur VI.4.3.

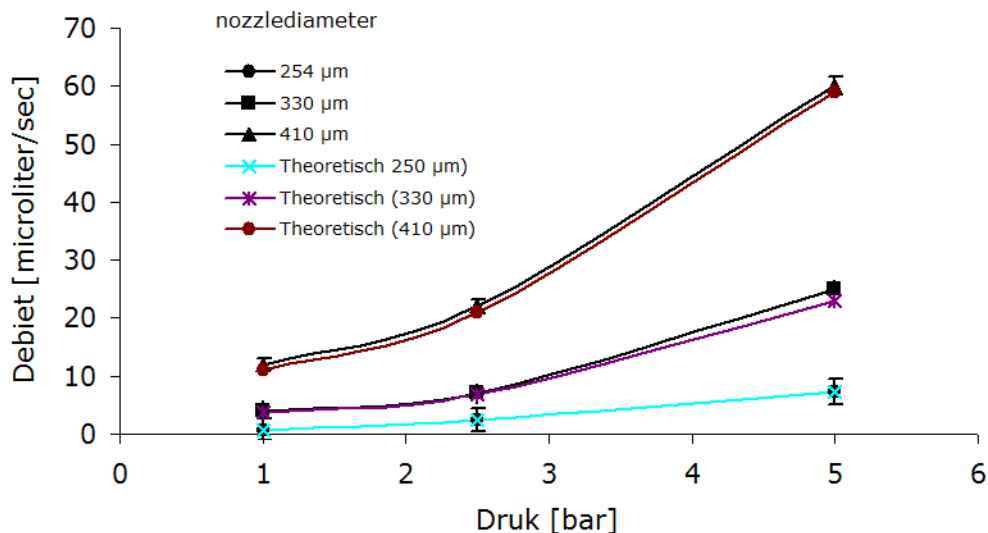


Figuur VI.4.3 - Debiet in functie van de druk voor een 30% (g/g) Pluronic® F127 BMA oplossing in water voor verschillende nozzlediameters, gebruik makende van de bioplotter (n=3).

Figuur VI.4.3 laat toe het debiet kwantitatief te controleren voor een gegeven nozzle bij een bepaalde druk. Het debiet is direct proportioneel aan de aangelegde druk en nozzlediameter. Hoe kleiner de nozzlediameter, hoe kleiner het debiet bij een gegeven druk. Hoe hoger de druk, hoe hoger het debiet voor een gegeven nozzlediameter.

In het analytisch model voor het beschrijven van het debiet (zie paragraaf VI.2.2) van een niet-Newtoniaanse vloeistof worden de constanten gesubstitueerd door experimenteel bekomen viscositeitsmetingen. Doordat de drukgradiënt onafhankelijk is van de Pluronic® F127 BMA concentratie kan elke concentratie aangewend worden. In dit geval werd er een 30% (g/g) concentratie gekozen voor de drukgradiënt van de pneumatische klep. De afschuifspanning γ werd arbitrair gekozen als 50 s^{-1} en ingevoerd in vergelijking VI.13. De enige parameter die overblijft voor de analytische uitdrukking van het debiet voor een 30% (g/g) Pluronic® F127 BMA oplossing is de drukgradiënt dP/dZ in vergelijking VI.20. De drukgradiënt is een unieke waarde voor elke depositiesysteem en is een functie van de nozzlediameter, druk en de interne geometrie dat het biomateriaal passeert doorheen het hele kleppensysteem. Het experimentele debiet kan ingevoerd worden in vergelijking VI.20, door gebruik te maken van de bepaalde waarden voor de constanten voor de concentratie, zodoende de drukgradiënt

dP/dZ te bekomen. De gemiddelde drukgradiënten worden vervolgens aangewend in de analytische expressie voor het debiet en vergeleken met de experimentele resultaten. In Figuur VI.4.4 worden de experimenteel en berekende debieten voor de verschillende nozzlediameters bij verschillende drukken weergegeven. De waarden zijn niet significant ($p < 0.05$) van elkaar verschillend.



Figuur VI.4.4 – Vergelijking van het experimenteel en berekende debiet voor verschillende nozzlediameters bij verschillende drukken ($n=3$).

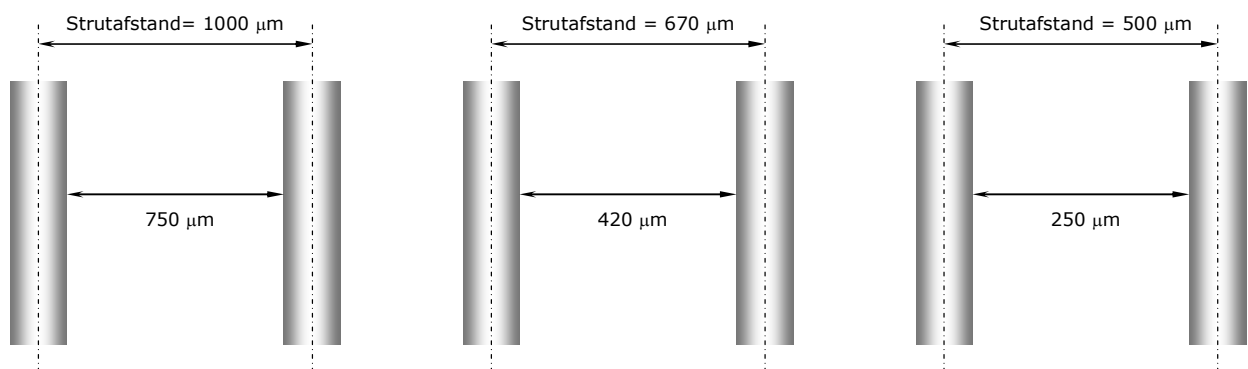
Men kan concluderen dat het procesmodel in paragraaf VI.2.2 succesvol kan aangewend worden voor het voorspellen van de debieten bij een gegeven druk en nozzlediameter.

VI.4.3. Controle van de poriëngrootte en porositeit.

Aangezien de poriëngrootte en porositeit een functie zijn van zowel de strutafstand en de strutdiameter en deze gecorreleerd zijn, gaan we uit van twee studies. De eerste studie gaat uit van een constante strutdiameter, de tweede studie van een constante strutafstand. De strutdiameters worden bekomen door gebruik te maken van hun ideale nozzlesnelheid. Patroonvariëaties (i.e. variërende hoeken waaronder twee opeenvolgende

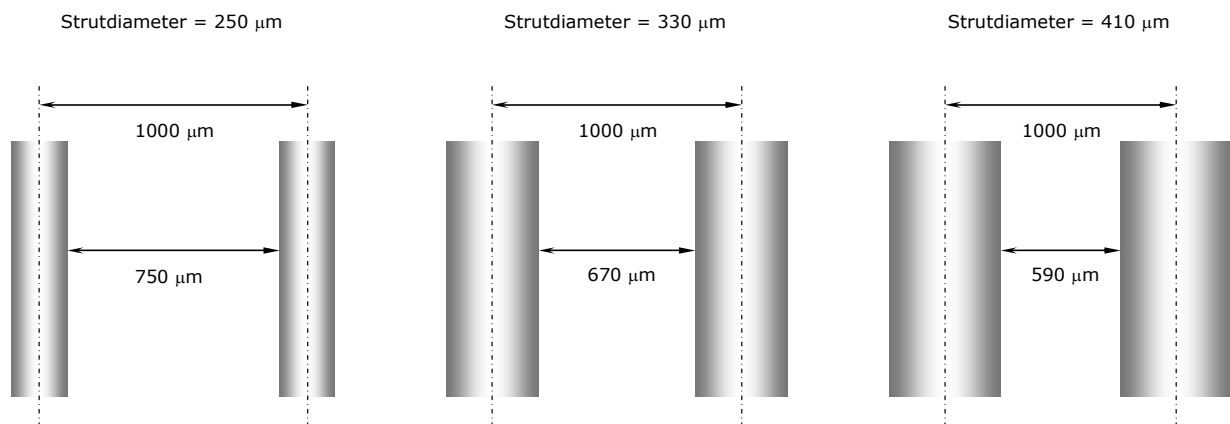
lagen worden geplot, cfr. 90° , 45° , ...) worden uitgetest, maar zijn niet opgenomen in dit werk. Patronen waarbij de hoek minder dan 45° of meer dan 135° bedraagt resulteren in een distortie tijdens het 3D plotten (559). Vanuit dit oogpunt worden de draagstructuren geplot met hoeken van 90° tussen de opeenvolgende lagen.

Studie I: bestuderen van het effect van de strutafstand in functie van de poriëngrootte bij een constante strutdiameter. Deze wordt uitgevoerd voor het bestuderen van de structurele vormgeving met vooropgestelde strutafstanden van: 1000, 670 en 500 μm en voor de productie van draagstructuren met poriëngrootte van 750, 420 en 250 μm respectievelijk met een constante strutdiameter van 250 μm , zoals weergegeven in Figuur VI.4.5.



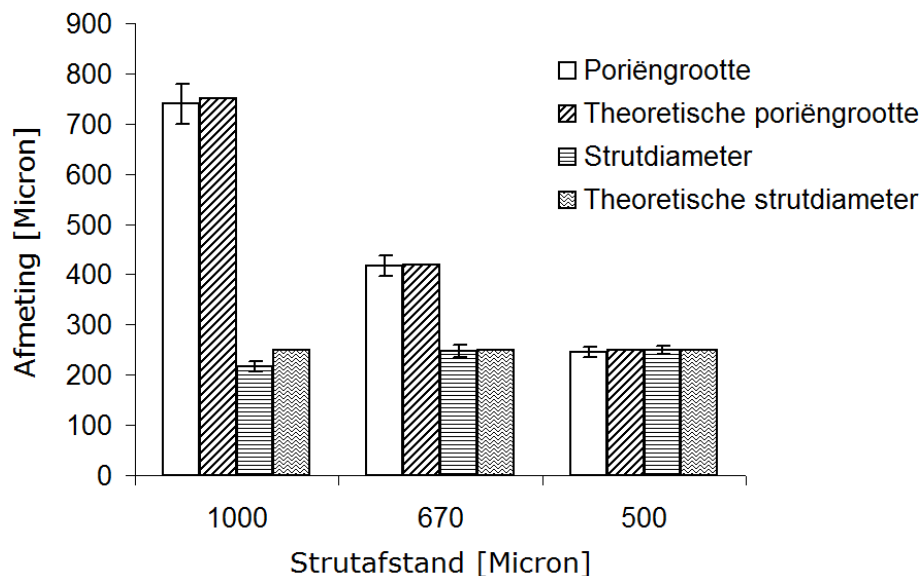
Figuur VI.4.5 - Schematische voorstelling van Studie I. Hierbij gaat men het effect van de strutafstand na op de poriëngrootte. De strutdiameter wordt constant gehouden op 250 micron.

Studie II: bestuderen van het effect van de strutdiameter op de poriegrootte bij een constante strutafstand. Deze wordt uitgevoerd voor het bestuderen van de structurele vormgeving in overeenstemming met de vooropgestelde, constante strutafstand met variërende strutdiameters met 250, 330 en 410 μm voor de productie van poriën van 750, 670, 590 μm , bij een constante strutafstand van 1000 μm , zoals weergegeven in Figuur VI.4.6. De strutdiameters worden gebruikt bij hun ideale snelheid v_N .



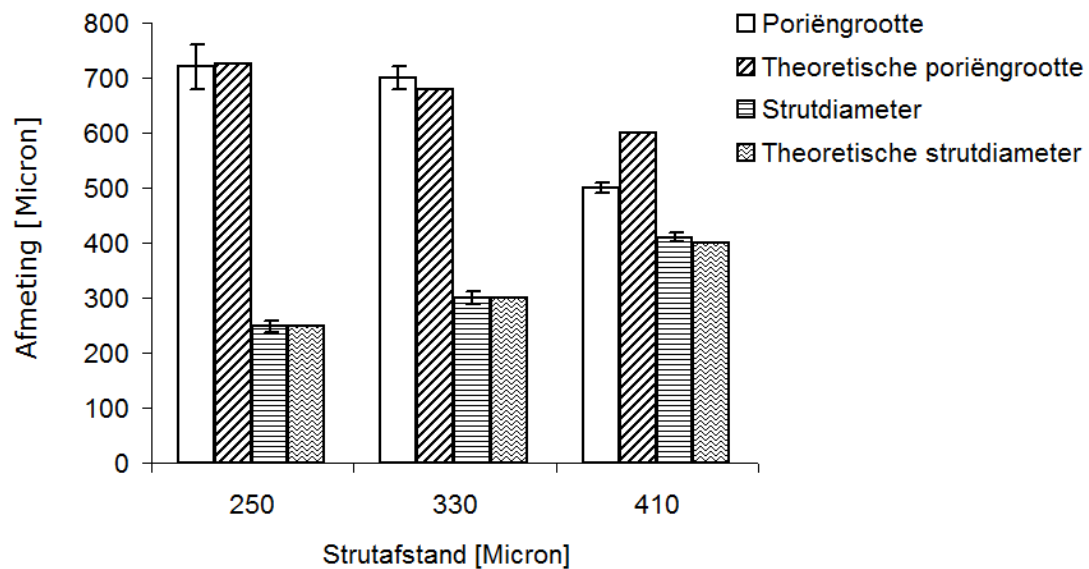
Figuur VI.4.6 - Schematische voorstelling van Studie II. Hierbij gaat men het effect van de strutdiameter na op de poriëngrootte. De strutafstand wordt constant gehouden op 1000 micron.

De resultaten uit studie I zijn weergegeven in Figuur VI.4.7 en tonen aan dat de bekomen waarden voor de poriëngroottes en de strutdiameters voor alle betreffende strutafstanden niet significant ($p < 0.05$) van elkaar verschillen met de theoretische waarden.



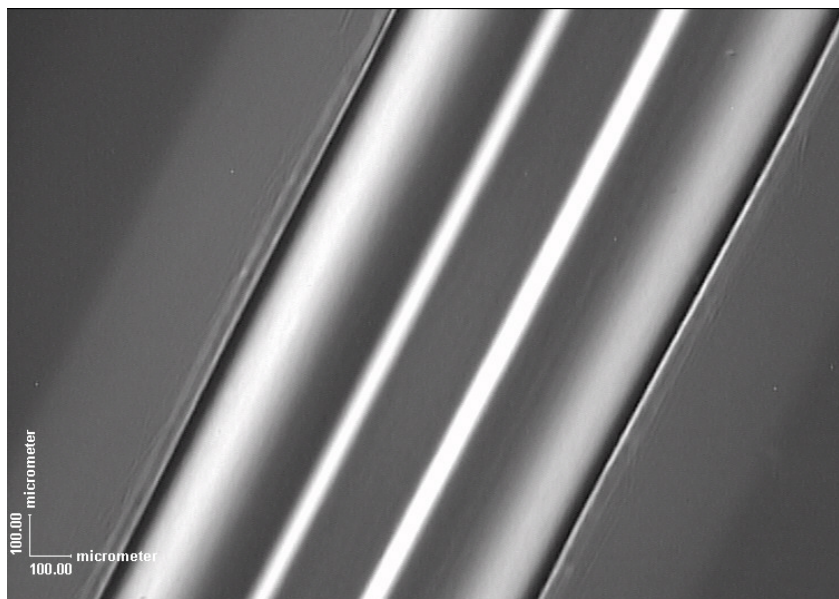
Figuur VI.4.7 - Resultaten van studie I met poriëngrootte en strutdiameters voor 1000 μm , 670 μm en 500 μm strut afstanden (constante strut diameter: 250 micron en druk: 1 bar) ($n=3$).

De resultaten uit studie II zijn weergegeven in Figuur VI.4.8 en tonen aan dat de bekomen waarden voor de poriëngroottes en de strutdiameters voor alle betreffende strutafstanden niet significant ($p < 0.05$) van elkaar verschillen met de theoretische waarden.



Figuur VI.4.8 - Resultaten van studie II met poriëngrootte en strutdiameters voor 750 μm , 670 μm en 590 μm strut afstanden (constante strut afstand: 1000 micron en druk: 1 bar) ($n=3$).

Figuur VI.4.9 toont een detailopname van een draagstructuur uit studie I met een strutafstand van 1000 μm , door gebruik te maken van een 250 μm nozzlediameter met een snelheid v_N van 10 mm/sec en een druk van 1 bar. De afstand opgenomen tussen de struts was 960 μm en de lengte van de vierkante porie was 720 μm voor de draagstructuren. De struts tonen een uniforme geometrie.



Figuur VI.4.9 - Microscopisch beeld van een een geplote strut van een Pluronic® F127 BMA 30% (g/g) draagstructuur.

Zoals aangetoond in paragraaf VI.3.3, werd studie I uitgevoerd om het effect te bestuderen van de strutafstand op de poriëngrootte bij een constante strutdiameter. De gekozen strutafstanden waren 1000, 670 en 500 μm voor het fabriceren van poriëngroottes van 750, 420 en 250 μm . De experimentele resultaten tonen aan dat de poriëngroottes en strutdiameters overeenstemmen met de waarden uit het theoretisch model Figuur VI.4.7. Studie II werd uitgevoerd om het effect te bestuderen van de strutdiameter op de poriëngroottes bij een constante strutafstand. De gekozen strutdiameters zijn 250, 330 en 410 μm voor het produceren van poriëngroottes van 720, 700 en 500 μm respectievelijk. De experimentele resultaten tonen aan dat de poriëngroottes en strutdiameters overeenstemmen met de waarden uit het theoretisch model (Figuur VI.4.8).

Men kan concluderen dat het procesmodel in paragraaf VI.2.4 succesvol kan aangewend worden voor het voorspellen van de debieten bij een gegeven druk en nozzlediameter.

VI.4.3.1. Analysetechnieken voor het meten van de porositeit van draagstructuren.

Onder de morfologische parameters voor het analyseren van een draagstructuur is de porositeit het meest geciteerd (585). Deze wordt uitgedrukt als de verhouding tussen het totale poriënvolume en de som van het poriënvolume en het materiaalvolume van de draagstructuur. Poreuze materialen kunnen drie verschillende porie types bevatten (586-588); (a) ingesloten poriën geïsoleerd binnen een matrix; (b) open of doorgaande poriën die het buitenoppervlak van de draagstructuur verbinden en de stroom van een vloeistof of gas van de ene naar de andere kant mogelijk maken; (c) blinde poriën in contact met een blootliggend of uitwendig oppervlak door een enkele opening. Al deze soorten poriën spelen een belangrijke rol in het ontwerp van een draagstructuur. Gesloten poriën zullen de afstand verminderen voor de diffusie van zuurstof en nutriënten naar het binnenste deel van de draagstructuur. Open poriën zijn essentieel voor de diffusie van voedingsstoffen en het transport van cellen. Blinde poriën hebben een minder gedefinieerde rol, althans zal hun aanwezigheid de gasdiffusie faciliteren in de structuur door de afstand te verminderen.

Verschillende technieken kunnen aangewend worden voor het bepalen van de morfologische eigenschappen van een draagstructuur. De Archimedes methode (587) is de eenvoudigste manier om de porositeit van een draagstructuur te bepalen en kan uitgevoerd worden met standaard labomateriaal. Het Archimedes principe stelt dat het verplaatste volume van een vloeistof (doorgaans water) door een volledig ondergedompeld object gelijk is aan het volume van het object. Metingen op basis van deze methoden veronderstellen dat de poriën binnenin de structuur volledig bevochtigd zijn. Aangezien hydrogelen water kunnen absorberen kan dit het resultaat beïnvloeden.

Kwik porosimetrie is gebaseerd op het fysische principe dat kwik niet in de poriën zal penetreren zolang er geen voldoende druk wordt uitgeoefend voor penetratie (589). Een nadeel van deze destructieve techniek is het gebruik van toxische stoffen. Alsook kan het

kwik niet in gesloten poriën dringen, waardoor dit soort porositeit niet kan gemeten worden

Micro-CT is een eenvoudige, niet destructieve techniek waarmee 3D datareeksen bekomen worden voor een kwalitatieve analyse van de porositeit (590). Micro-CT is een radiografische beeldvormingstechniek gelijkaardig aan de conventionele computer tomografie CT die gebruikt worden in medische en industriële toepassingen (591). In tegenstelling tot deze systemen met een typisch maximale resolutie van ongeveer 1 mm³, is micro-CT geschikt voor het bereiken van een resolutie in de orde van 1 µm³ en minder (587). Deze techniek kan aangewend worden voor het in beeld brengen van vasculaire ingroei in een draagstructuur (592). Voor kwantitatieve resultaten is een significant hogere resolutie vereist, SRµCT is hiervoor een gepaste techniek (593).

VI.4.4. De sleutelparameters voor het plotten van een Pluronic® F127 BMA oplossing.

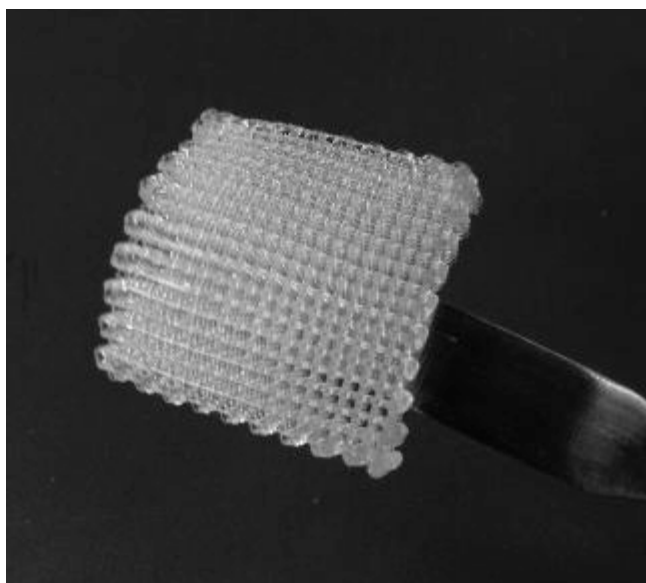
De draagstructuren worden ontworpen zodanig dat ze parallelle struts hebben op elke 0/90 laag. De ruimte tussen de struts is 1 mm en afmetingen van elke laag is 10 x 10 mm². De diameter van de nozzle was 250 µm en de snelheid v_N en de druk waren 1000 mm/sec en 1.0 bar respectievelijk, gebaseerd op de berekende snelheid. De druk wordt zo laag mogelijk gehouden om celbeschadiging te voorkomen. De pneumatische klep wordt gesloten telkens een rechte strutlijn is vervolledigd en wordt opnieuw geopend wanneer er een nieuwe lijn gevormd wordt. De sleutelparameters voor de experimenten zijn weergegeven in Tabel VI.4.1.

Tabel VI.4.1 - Ingestelde parameters bij het plotten van de Pluronic® F127 BMA 30% (g/g) hydrogelen.

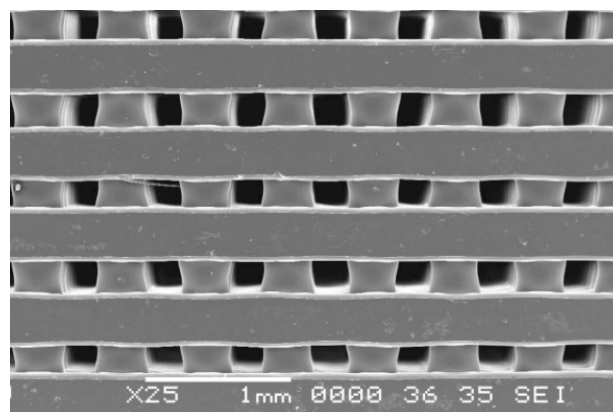
Parameter	Waarde
Druk	1.0 bar
Printsnelheid (xy)	1000 mm/min
Printsnelheid (z)	150 mm/min

Afzettingsoppervlak	Glasplaat
Hydrogelconcentratie	30 (g/g)%
Nozzlediameter	variabel
laagdikte	0.4 mm
Dispensietemperatuur	20°C
Tijd 'preflow'/'postflow'	1 sec.

Op Figuur VI.4.10 is een 3D draagstructuur weergegeven, hierbij kan men zien dat men via een laagsgewijze manier een poreuze structuur kan opbouwen. Vernetten gaat door een UV blootstelling gedurende 30 min. De gelfractie op de draagstructuur bedraagt 85.2%.



Figuur VI.4.10 - Afbeelding van een 3D geplotte Pluronic® poly(F127 BMA) draagstructuur, vernet door UV irradiatie in aanwezigheid van Irgacure 2959 (1 mol%).



Figuur VI.4.11 - SEM opname van een vernette Pluronic® F127 BMA 30% (g/g) oplossing, bovenaanzicht (vergroting 25x).

De ingestelde waarden van de parameters zijn vergelijkbaar met waarden opgenomen in de literatuur. Fedorovich et al (575) plotten Pluronic® F127 AlaL (als draagstructuur voor een bottransplantaat) met een snelheid van 960 mm/min, de gebruikte naald had een binnendiameter van 210 μm en een druk van 2 bar. De plaat waarop werd geprint heeft een temperatuur van 4°C. Hierbij worden uniforme, continue extrusievezels bekomen. In hoofdstuk I worden enkele vereisten opgesomd met betrekking tot draagstructuren. Hierin werd afgeleid dat het gewenst is om over een zo groot mogelijke interconnectiviteitsgraad te bezitten met het oog op celuitzaaiing. Er werd vastgesteld dat de biplotter techniek hieraan kan voldoen. De bovenaanzichten bevestigen de regelmatige laag-na-laag depositie van de hydrogelstruts. Uit dit aanzicht is duidelijk af te leiden dat homogene struts worden geplot met een homogene spatiëring.

VI.5. Polymeerverwerking via elektrospinnen van Pluronic® F127 derivaten.

Het ontwerpen en ontwikkelen van functionele materialen in biomedische toepassingen is een grote uitdaging (594). Biopolymeren zijn vaak wateroplosbaar en kunnen dus gesponnen worden uit een waterige oplossing (595-596). Elektrospinning is een wijdverspreid proces voor het creëren van vezels met diameters in het nanometer tot micron gebied. Elektrospinning is reeds aangewend in een aantal industrieën zoals:

filtratie (597), katalyse (598) en biomaterialen (597, 599-601). Een groot deel van polymeren zijn reeds geëlektrospind, inclusief biopolymeren zoals collageen (602), zijde (603) en hyaluronzuur (604). Hydrofiele polymeren zoals poly(ethyleenglycol) (605) en poly(2-hydroxyethyl methacrylaat) (606) en hydrofobe polymeren zoals poly(lactide-co-glycolide) (607) en poly(caprolacton) (608). Een verscheidenheid aan morfologieën is reeds gecreëerd door elektrospinning. De mogelijkheid van elektrospinning voor het produceren van vezels met een brede diversiteit van diameters en het feit dat de structuur de extracellulaire matrix kan mimeren, heeft dit tot een waardevol instrument gemaakt in de biomimetische weefselregeneratie. De basisprincipes van elektrospinnen zijn reeds lang gekend en de effecten van verschillende procesparameters op de vezel morfologie zijn uitvoerig bestudeerd (609-610). De bijzondere eigenschappen van geëlektrospinde nanovezel membranen omvatten: hoog actief oppervlak, hoge porositeit, flexibiliteit en een stuurbare poriegrootte distributie, waardoor deze een geschikte kandidaat zijn in een wijde selectie van toepassingen in het biomedische veld (610-614). Het ontwerp van hiërarchische architecturen die de extracellulaire matrix (ECM) van het natuurlijk weefsel mimeren is belangrijk voor een snelle regeneratie (615).

Poly(ethyleen oxide) wordt veelvuldig gebruikt als spinningsmiddel. PEG laat toe om andere polymeren te spinnen dewelke geen vezels uit zichzelf vormen (616-619). Plurionics[®] hebben een gelijkaardige structuur als PEO, maar worden ondanks hun interessante eigenschappen nauwelijks toegepast voor elektrospinning. In de literatuur is het gebruik van Plurionics[®] voor elektrospinning beperkt en worden deze gemengd met andere polymeren zoals PVA (620) en polycaprolacton (621-623). Met een toenemende hoeveelheid Plurionics[®] zal de vezeldiameter toenemen, alsook zal de uniformiteit en homogeniteit van de vezel verbeteren. Alsmede zullen met een stijgende concentratie aan Plurionics[®] de mechanische eigenschappen verbeteren. Door het inmengen van Plurionics[®] kan het materiaal de cellulaire proliferatie ondersteunen voor het regenereren van huidweefsel (621). In combinatie met poly(ϵ -caprolacton-co-melkzuur) werd het getest voor huidregeneratie (624) en voor wondherstel (625-626). Het elektrospinnen van Plurionics[®] kan gebruikt worden voor bijvoorbeeld micro-encapsulatie (627) of als

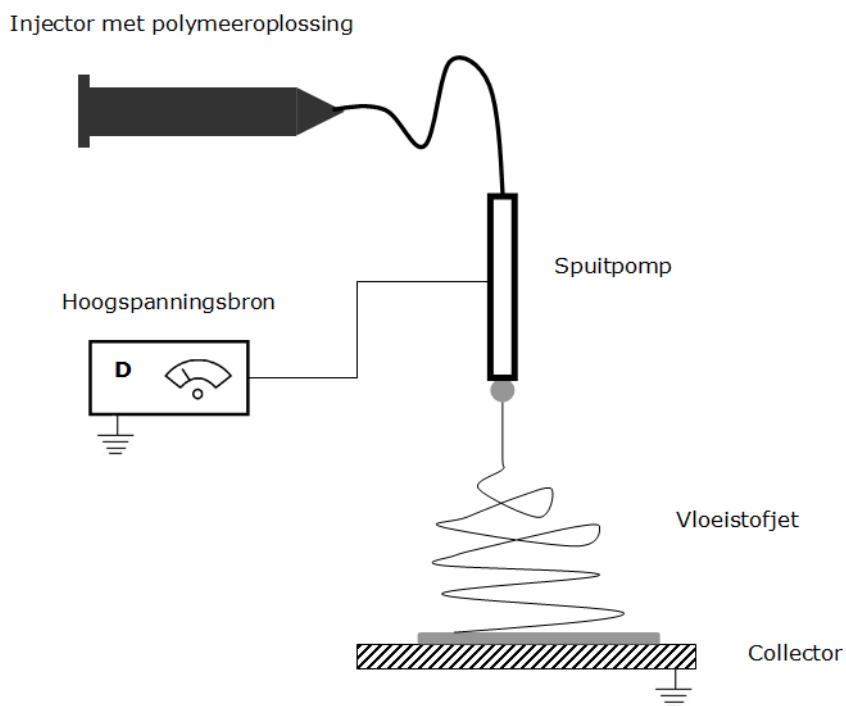
coating in medische toepassingen (628). In dit deel wordt ter aanvulling van de polymeerverwerking de mogelijkheid nagegaan om de Pluronic[®] derivaten te deponeren door elektrospinnen. In de volgende paragraaf wordt er een prelimiaire haalbaarheidsstudie uitgevoerd.

VI.5.1. Variabelen van het elektrospinningsproces.

Door de complexiteit van het elektrospinningsproces zijn er een groot aantal variabelen die de morfologie kunnen veranderen van de geëlektrospinde materialen. Deze variabelen kunnen onderverdeeld worden in twee categorieën: de eigenschappen van de polymeeroplossing en de procesparameters van het elektrospinningstoestel. Deze parameters beïnvloeden de eigenschappen zoals de oppervlakteladingsdensiteit, solvent verdampingssnelheid en de oppervlaktespanning, dewelke uiteindelijk de diameter en de morfologie van de afgezette vezels zal bepalen. Allerhande parameters kunnen aangepast worden, waaronder: moleculair gewicht, moleculaire gewichtsverdeling, polymeerarchitectuur (lineair, vertakt), oplossingseigenschappen (viscositeit, conductiviteit, oppervlaktespanning), elektrische potentiaal, debiet, concentratie, afstand tussen het cappilair en de collectorplaat, omgevingsparameters (temperatuur, vochtigheid), beweging en grootte van de collector, diameter van de naald,

VI.5.2. Elektrospinnen van Pluronic[®] F127 di-IPTS.

Een standaard labo opstelling voor elektrospinning is weergegeven in Figuur VI.5.1. Typisch bestaat de opstelling uit een injector die verbonden is met een hoogspanningsbron (5 tot 50 kV), een gelijkspanningsvoeding (DC), een spuitpomp en een collector.

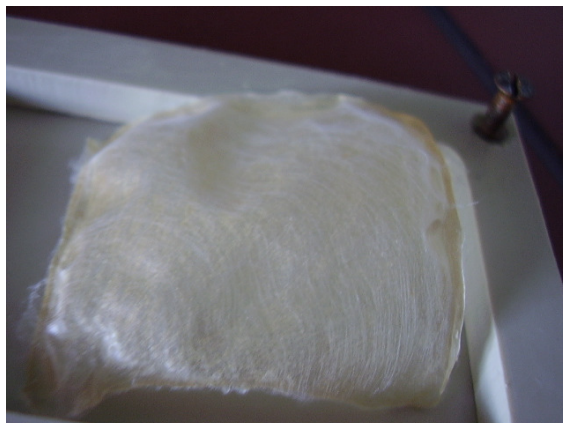


Figuur VI.5.1 - Het principe van elektrospinnen.

Een polymeeroplossing wordt geladen in de spuit en wordt geëxtrudeerd uit een naald bij een constante snelheid, hetgeen een kleine druppel vormt aan de naaldpunt. Deze druppel wordt geladen bij hoge spanning, wat resulteert in een opeenstapeling van lading op het oppervlak van de druppel. Deze opbouw veroorzaakt elektrostatische repulsie wat de druppel zal destabiliseren, vervolgens zal zich een kegelmorfologie vormen; bekend als de 'taylor' kegel. Een geladen vloeistofjet wordt gevormd uit de punt van de kegel naar het doel dat geaard is of tegengesteld geladen is aan de polymeeroplossing. Terwijl de straal in beweging is, zal de oppervlakteladingsdichtheid onstabiel worden waarbij er een willekeurige, chaotische straal ontstaat. Het solvent in welke het polymeer wordt opgelost zal verdampen tijdens het spinnen waardoor er vaste polymeervezels worden afgezet. Hydrogelen zijn moeilijker te elektrospinnen. Ze hebben een gelimiteerde oplosbaarheid in organische solventen, waardoor het gebruik van waterige oplosmiddelen vereist is. Echter zal de combinatie van de lage volatiliteit van water en de affiniteit van het hydrogelmateriaal voor water door het droogproces vertragen voor het polymeerstaal. Dit resulteert in de depositie van eerder nat materiaal dan droge

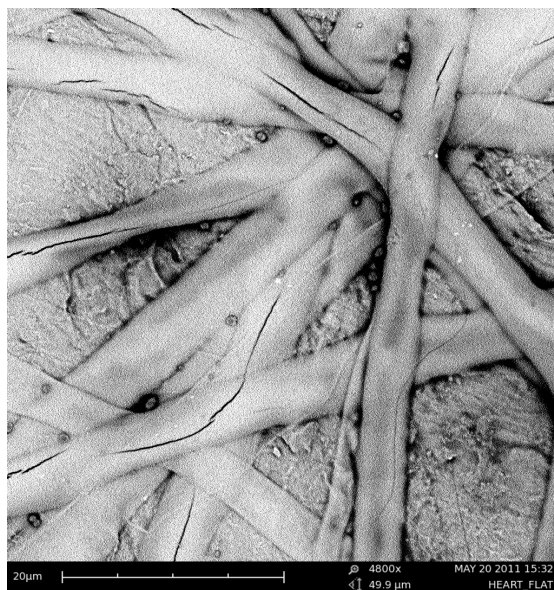
polymeervezels. Gedecellulariseerd hartweefsel van een varken (Equiner Perikardpatch, 5x5 cm, AutoTissue, Berlijn) wordt gebruikt als dragermateriaal voor het elektrospinnen van de Pluronic® F127 di-IPTS. De keuze van dit materiaal kadert in het onderzoek voor de constructie van een bioactieve contractiele patch voor cardiale regeneratie.

Het materiaal wordt vastgeklemd en gedroogd bij kamertemperatuur in een teflon mal. Vervolgens werd het materiaal geëlectrospind met een oplossing Pluronic® F127 di-IPTS.



Figuur VI.5.2 - Gedecellulariseerde hartweefsel (varken) voorzien van een laag Pluronic® F127 di-IPTS via electrospinning.

Voorgaande preliminaire testen tonen aan dat men weefsel kan voorzien van een geëlectrospinde laag met subsequeante vernetting via de triethoxysilaan derivaten. Andere testen van bis(meth)acrylaatderivaten worden zonder succes uitgevoerd. Een representatief beeld van een geëlectrospinde polymeervezel van Pluronic® F127 di-TESI is weergegeven in Figuur VI.5.3.



Figuur VI.5.3 - SEM opname van Pluronic® F127 di-TESI, aangebracht door electrospinning.

VI.6. Conclusies.

Via de bioplotter technologie werden reproduceerbare draagstructuren bekomen van Pluronic® F127 BMA hydrogelen via een laagsgewijze depositie van hydrogelstruts met een vernette, perfect interconnectieve structuur.

Een procesmodel voor de strutdiameter werd opgesteld. Hieruit werd geconcludeerd dat deze een functie is van de nozzlesnelheid, de binnenste straal van de nozzle, de krachtwetindex van de vloeistof, de viscositeit, shear rate en de drukgradiënt. De snelheid waarmee de oplossing geëxtrudeerd wordt kan afgestemd worden op de bewegingssnelheid van de extrusiekop in het XY-vlak. Hieruit bekomt men de ideale strutdiameter waarbij de nozzle aangewend wordt bij zijn ideale druk en snelheid, zodoende de geplote strutdiameter gelijk is aan de nozzlediameter.

Een analytisch model voor het voorspellen van het debiet van Pluronic® werd opgesteld als een veralgemeende Poiseuille vergelijking voor een niet-Newtoniaanse vloeistof. Het debiet kan gecontroleerd worden voor een gegeven nozzle bij een bepaalde druk, waarbij het debiet direct proportioneel is aan de aangelegde druk en nozzlediameter. De porositeit is een functie van zowel de strutafstand en de strutdiameter. Daardoor werd er

uitgegaan van twee theoretische modellen (één met constante strutdiameter en een tweede met constante strutafstand). De theoretische procesmodellen voor debiet en porositeit werden vergeleken met de experimenteel bekomen waarden en vertonen geen significante verschillen.

In een laatste deel werd Pluronic[®] F127 di-IPTS succesvol afgezet via elektrospinnen op gedecellulariseerd hartweefsel.

VII Conclusies.

VII.1. Algemeen besluit.

Dit werk had als doelstelling nieuwe materialen te ontwikkelen die een antwoord kunnen bieden aan de grote kloof tussen vraag en aanbod van organen voor transplantatie. Een bijdrage werd geleverd aan de ontwikkeling van een methodiek voor zachte weefselregeneratie door gebruikt te maken van een nieuwe generatie poreuze hydrogelen. Een geschikt kandidaat biomateriaal is het commercieel beschikbare Pluronic® F127 blokcopolymeer dat door de 'U.S. Food and Drug Administration' (FDA) is goedgekeurd voor medische en farmaceutische toepassingen. Ze worden ingedeeld in het segment van de niet-ionaire, hydrofoob associërende tensio-actieve stoffen. Waterige oplossingen van Pluronic® F127 zijn micellaire vloeistoffen bij kamertemperatuur en vormen een gel bij fysiologische temperatuur. Voor klinisch gebruik is er op heden enkel een gelformule goedgekeurd door de FDA die Pluronic® F127 bevat met de naam LeGoo®, dit wordt toegepast voor tijdelijke endovasculaire occlusie van aders. De structurele eigenschappen van de gel stemmen overeen met die van zacht weefsel. Echter volstaan de korte *in vivo* verblijftijden en zwakke mechanische eigenschappen niet voor de meeste klinische toepassingen. Om hieraan tegemoet te komen werden er verschillende polymeriseerbare Pluronic® F127 macromonomen gesynthetiseerd en gekarakteriseerd. Dit met als doel de fysische gelering te koppelen aan de voordelen van een covalent vernet netwerk. Hiertoe werden zes eindgroep gemodificeerde Pluronic® F127 derivaten ontwikkeld in hoog rendement: een methacrylaat, acrylaat, amine, acrylamide, thioacetaat en een 3-isocyanatopropyltriethoxysilaan. Het methacrylaat en acrylaat derivaat werden gesynthetiseerd uitgaande van het zuur chloride. Een directe thiolering van de hydroxylfuncties met mercaptaanzuur gaat door in lage rendementen,

alsook bestaat de mogelijkheid dat vrije thiolfuncties kunnen dimeriseren. Daarom werd er geopteerd om een beschermd thiol in te voeren; een thioacetaat. Dit werd bekomen door het invoeren van een tosylaatgroep, die in een volgende stap werd omgezet in het thioactetaat door reactie met kaliumthioacetaat. Het tosylaatderivaat laat tevens toe om een amine te bekomen door een substitutiereactie met ammoniak. Dit werd omgezet met een zuur chloride naar het acrylamide. Een silaanderviaat (IPTS) werd bekomen door reactie van Pluronic® F127 met (3-isocyanatopropyl)triethoxysilaan. Alle derivaten werden gekarakteriseerd door FTIR en $^1\text{H-NMR}$. De ontwikkeling van de verschillende derivaten laten verscheidene polymerisatiestrategieën toe in het streven naar milde condities voor een gecombineerd gebruik met cellen.

Pluronic® F127 bismethacrylaat werd geselecteerd als referentiemateriaal. Een derivaat met een hogere reactiviteit werd bekomen met Pluronic® F127 bisacrylaat. Een acrylaat zal immers een snellere polymerisatiekinetiek vertonen ten opzichte van een methacrylaatderivaat onder dezelfde condities. Niettegenstaande de hoge viabiliteiten voor Pluronic® F127 bismethacrylaat kunnen de radicalen, gevormd door reactie van een UV foto initiator, de cellen schade berokken bij encapsulatie. Daardoor werd bijkomend het bithioacetaat en acrylamide gesynthetiseerd, dewelke precursoren zijn voor een initiatorloze Michaël type reactie. Een laatste initiatorvrij systeem werd bekomen met Pluronic® F127 di-IPTS, dewelke kan polymeriseren door een condensatiereactie (na hydrolyse van de ethoxygroepen) bij fysiologische temperatuur.

De fysische gelering dient behouden te blijven na modificatie om deze via de bioplotter technologie te kunnen verwerken. De invloed van de chemische aanpassingen op cruciale fysico-chemische parameters zoals het miceleringsgedrag en het geleringsgedrag werd uitvoerig bestudeerd.

Het wijzigen van de eindgroep naar een apolaire functie zal het vertroebelingspunt doen dalen. Hierdoor heeft Pluronic® F127 BMA een lager vertroebelingspunt in vergelijking met Pluronic® F127. Uit bepaling van de kritische miceltemperatuur (CMT) werden de thermodynamische parameters ΔH° , ΔS° en ΔG° bekomen. De verschillen in thermodynamische parameters kunnen als niet significant beschouwd worden tussen een

Pluronic® F127 en het BMA derivaat. Via DLS werd info verkregen over de miceldimensies. Uit de metingen blijkt dat de chemische modificatie van de hydroxylgroepen geen significante vergroting van de miceldiameter tot gevolg heeft. Ook na modificatie komen de micellen voor in een monomodale verdeling met een gemiddelde waarde van de micelgrootte van $21 \text{ nm} \pm 1$. Ze bezitten een vergelijkbaar maximum en hebben geen significant verschil in polydispersiteitsindex. Het miceleringsgedrag werd bestudeerd voor Pluronic® F127 en Pluronic® F127 BMA. Het geleringsgedrag werd gekarakteriseerd voor alle derivaten, gezien dit de belangrijkste parameter is in de finale toepassing. De gateringseigenschappen werden bepaald via DSC, oscillatiereologie en de '*tube inversion method*'. Uit deze studies blijkt dat de chemische modificatie van de eindgroepen aanleiding geeft tot een verhoging van de gateringstemperatuur voor alle derivaten.

Uit oscillatiereologietesten is gebleken dat voor Pluronic F127® BMA er niet enkel een verhoging is met de gateringstemperatuur van 3 à 4 graden Celsius waarneembaar is, maar ook de sterkte van de gelen verminderd ten opzichte van Pluronic F127®. Uit het sol-gel-sol fasendiagramma voor Pluronic® F127 en BMA werd er naast een verhoging van de sol-gel temperatuur een sterke verlaging van de gel-sol transitietemperatuur waargenomen. De chemische modificatie van de hydroxyl eindgroepen zorgt voor een verlaging van de thermische stabiliteit van de fysische hydrogelen en veroorzaken een reductie van het gel-gebied in het fasendiagramma. De gatering bij fysiologische omstandigheden blijft gevrijwaard voor alle derivaten. Het toevoegen van een fysiologisch zoutconcentratie resulteert in een verlaging van de gateringstemperatuur en een toename in de gelsterkte.

Covalent vernette Pluronic® F127 hydrogelen werden bekomen met hoge gelfracties en met behoud van hun thermo responsieve eigenschappen. Irgacure 2959 werd aangewend als een niet cytotoxische UV foto initiator voor het polymeriseren van Pluronic® F127 oplossingen. Oplossingen met een hogere concentratie aan Pluronic® F127 BMA zullen significant sneller een maximale gelfractie bereiken dan lagere concentraties. De temperatuur heeft een belangrijke invloed op het zwelgedrag van de bekomen hydrogel.

Bij 20°C zal de hydrogel meer water absorberen dan bij 37°C en zal bij evenwichtszwelling 30% hoger liggen voor een vernetting 30 % (g/g) Pluronic® F127 BMA. De evenwichtszwellingsgraad daalt van 780% ± 10% naar 250% ± 15% voor een 30 % (g/g) Pluronic® F127 BMA indien de temperatuur stijgt van 2°C naar 60°C. De hydrogelen zullen water uitstoten door opwarmen en geven aanleiding tot krimp.

In het kader van transplantatiedoelinden dient het materiaal een snelle diffusie toe te laten van nutriënten en afvalstoffen, alsook voor ieder belangrijk metabolisch product. De hydrogelen zijn bruikbaar voor de gecontroleerde afgifte van macromoleculaire structuren zoals BSA en FITC dextraan. Er werden twee verschillende moleculaire gewichten van FITC dextraan onderzocht als model; FD40 en FD260. Het dextraan FD40 vertoont een 'burst-release' diffusiepatroon, terwijl de vrijstelling van dextraan FD260 vertraagd verloopt uit een 30% (g/g) Pluronic® F127 BMA hydrogel. Als modelproteïne voor de vrijstelling van proteïnen uit hydrogelmatrices werd runderalbumine (BSA) geselecteerd. Er werd besloten dat een lagere polymeerconcentratie aan Pluronic® F127 BMA aanleiding geeft tot een snellere cumulatieve vrijstelling van BSA in functie van de incubatietijd. De aanwezigheid van een ester bevattende reactiepartner maakt de hydrogel gevoelig voor hydrolytische degradatie. De evenwichtszwelling is omgekeerd afhankelijk van de vernettingsdichtheid; zodra degradatie verder gaat en de esterbinding hydrolyseert, zal de vernettingsdichtheid afnemen, met als gevolg dat de evenwichtszwelling zal toenemen.

De reactieve centra gegenereerd door een radicaal geïnitieerd vernettingsproces kunnen de cellen schade berokken. Hiertoe werd er geopteerd voor initiatorvrije systemen zoals een Michaël-type reactie en een siloxaanreactie. Aangezien Pluronic® F127 bithiol ongecontroleerd kan dimerizeren werd er een bithioacetaat gesynthetiseerd. Na 60 min zal de functie maximaal ontschermd zijn in een basische (0.2 M NaOH) oplossing. Aansluitende testen om deze vrije thiol functies te polymeriseren met commercieel beschikbare acrylaat vernetters lukken niet. Een alternatieve methode werd onderzocht waarbij Pluronic® F127 bisacrylaat gecombineerd werd met een commerciële thiol vernetter. Er werd succesvol een netwerk bekomen na emulsificatie. In vergelijking met

een BMA systeem kunnen er hydrogelen met veel grotere dimensies gevormd worden. Het (3-isocyanatopropyl)triethoxysilaan derivaat van Pluronic® F127 kan hydrolyse ondergaan. De reactieve silanolgroepen die hierbij ontstaan kunnen polymeriseren door een polycondensatiereactie. De lange reactietijd bij fysiologische temperatuur (20 dagen) is het grootste nadeel van dit systeem en maken deze ongeschikt voor de finale toepassing.

Voor het versterken van de hemocompatibiliteit werd er een membraanmimetische structuur ontworpen. Een methacrylaat derivaat van fosforylcholine werd hiervoor gesynthetiseerd (MPC) door gebruik te maken van de fosforamidietroute. Het zwitterionisch fosforylcholine heeft een uitstekende weerstand voor aspecifieke proteïne adsorptie en celadhesie. Depositie van een methacrylaatderivaat van dopamine (DAMA) laat de immobilisatie toe van dubbele bindingen op een substraat door dipcoating. Op deze onverzadigde verbindingen werden enten van poly(MPC) bekomen door een radicalaire polymerisatiereactie.

Een 'grafting from' entpolymerisatiereactie werd uitgevoerd van MPC op Pluronic® F127 BMA. Het entproces werd bestudeerd aan de hand van statische contacthoekmetingen (SCA), XPS en ellipsometrie. Langere UV bestralingstijden geven aanleiding tot een grotere hoeveelheid geënt poly(MPC). Een aanvullende methode om het MPC covalent te immobiliseren werd uitgevoerd door een copolymerisatie met Pluronic® F127 BMA. Uit statische contacthoek metingen werd er afgeleid dat copolymeren van Pluronic® F127 BMA met PCM resulteren in hydrofielere oppervlakken ten opzichte van Pluronic® F127 BMA.

In een laatste deel werden de bekomen hydrogelen preliminair in vitro biologisch geëvalueerd. Er werd geconcludeerd dat een chemische modificatie van Pluronic® F127 leidt tot een significant verschil in cytotoxiciteit na 24 uur voor MC3T3 cellen, met uitzondering van het bisacrylaatderivaat (lage celviabiliteiten). Uit de celviabiliteitsstudies is gebleken dat Pluronics® de biologische membraanstructuur kunnen aantasten. Hierdoor is het gebruik van membraan stabiliserende additieven aangewezen.

In een laatste stuk werden de plotparameters op punt gesteld voor een Pluronic® F127 BMA hydrogel. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een biplotter van SysEng, waarmee reproduceerbare draagstructuren bekomen werden met perfecte, interconnectieve, poreuze en vernette eigenschappen. Een procesmodel voor de strutdiameter werd opgesteld. Hieruit werd geconcludeerd dat deze een functie is van de nozzlesnelheid, de binnenste straal van de nozzle, de krachtwetindex van de vloeistof, de viscositeit, shear rate en de drukgradiënt. De snelheid waarmee de oplossing geëxtrudeerd werd kan afgestemd worden op de bewegingssnelheid van de extrusiekop in het XY-vlak. Hieruit bekomt men de ideale strutdiameter waarbij de nozzle aangewend werd bij zijn ideale druk en snelheid, zodoende de geplote strutdiameter gelijk is aan de nozzlediameter. De poriëngrootte varieerde tussen de 250 en 750 micrometer en de strutdiameter tussen de 102 en 406 micrometer. Een analytisch model voor het voorspellen van het debiet van Pluronic® werd opgesteld als een veralgemeende Poiseuille vergelijking voor een niet-Newtoniaanse vloeistof. Het debiet kan gecontroleerd worden voor een gegeven nozzle bij een bepaalde druk, waarbij het debiet direct proportioneel is aan de aangelegde druk en nozzlediameter. De porositeit is een functie van zowel de strutafstand en de strutdiameter. Daardoor werd er uitgegaan van twee theoretische modellen (één met constante strutdiameter en een tweede met constante strutafstand). De theoretische procesmodellen voor debiet en porositeit werden vergeleken met de experimenteel bekomen waarden en vertonen geen significante verschillen.

VII.2. Toekomstperspectieven.

Ondanks de gunstige eigenschappen en het uitstekende potentieel van Pluronic® F127 hydrogelen voor zachte weefselregeneratie, dient er aan verschillende uitdagingen tegemoet te komen. Het vormen van netwerken onder fysiologische condities in direct contact met cellen en biologische moleculen zijn veelbelovend. Een gecombineerd gebruik met multipotente stamcellen die kunnen differentiëren tot verschillende celtypes kan in dit onderzoek een innovatieve bijdrage leveren. Hiertoe dient het genotoxisch

karakter onderzocht te worden van de materialen om het genexpressiepatroon van de cellen te verifiëren in functie van de tijd. Daarnaast zijn de belangrijke eigenschappen van een draagstructuur zoals: zwelling, mechanische eigenschappen, degradatie en diffusie nauw verwant aan de vernetste structuur van de hydrogel. Een belangrijke bijdrage van de synthetische hydrogelen is het feit dat verschillende soorten chemie geïncorporeerd kunnen worden in het netwerk. Een wijziging in de macromonomeer concentratie in oplossing of in de functionaliteit van het macromonomeer zal de uiteindelijke gelstructuur en degradatie bepalen. Degradatie kan gestuurd worden door het incorporeren van hydrolytisch of enzymatisch labiele segmenten in de hydrogel of door een combinatie met natuurlijke biopolymeren die gevoelig zijn voor enzymatische degradatie. Bovendien moet de commerciële haalbaarheid en opschaling worden overwogen. Voor het opschalen van de productie van het meest beloftevolle Pluronic® F127 bisacrylamide dient de tosyleringsstap en amineringsstap verder geoptimaliseerd te worden. Reactietijden dienen verkort te worden om de synthese economisch rendabel te maken.

Men dient rekening te houden met het feit dat draagstructuren in combinatie met cellen en groeifactoren moeilijk kunnen bewaard worden vanwege hun levensvatbaarheid en stabiliteit. Hierdoor is het aangewezen om de structuren op aanvraag te produceren. Het encapsuleren van cellen in een biodegradeerbare hydrogel opent tal van toekomstperspectieven, waaronder een eenvoudige handeling waarbij cellen gemengd kunnen worden in de oplossing voorafgaand aan de gatering. Dit zorgt voor een zeer uniforme verdeling van de cellen doorheen de structuur, alsook een hoog gehydrateerde weefselachtige omgeving en de mogelijkheid om zich *in vivo* te ontwikkelen.

De gevoeligheid van hydrogelen voor conventionele sterilisatiemethoden blijft een belangrijk aandachtspunt. Het is van cruciaal belang dat een biomateriaal bestand is tegen een efficiënte sterilisatie om goedkeuring te krijgen van regelgevende organisaties en om veilig over te gaan tot klinische proeven. Een mogelijkheid is om gebruik te maken van gammastralen, hetgeen zeer efficiënt is, maar schadelijk kan zijn voor groeifactoren.

Een meer geschikte methode is door gebruik te maken van ethyleenoxide gas of een antibacteriële filter. De impact van de sterilisatiemethoden op de intrinsieke eigenschappen van de systemen is onvoldoende bestudeerd en verder onderzoek is aangewezen.

De sleutelparameters die in dit werk op punt werden gesteld voor het plotten van een Pluronic® oplossing dient getoetst te worden aan het simultaan plotten met geëncapsuleerde cellen. Dit kan voorafgaan met de incorporatie van extracellulaire matrix mimetische structuren zoals het MPC. Het electrospinnen van Pluronic® F127 di-IPTS kan gebruikt worden voor micro-encapsulatie of als coating in medische toepassingen.

De klinische proeven die uitgevoerd werden voor geneesmiddelaafgiftesystemen en als farmaceutisch ingrediënt illustreren de brede interesse van innovatieve Pluronic® formuleringen. Een dergelijke chemische en biologische veelzijdigheid suggereert fundamentele vooruitgang in het onderzoek van Pluronic® F127 hydrogelen als een klinisch materiaal voor weefselregeneratie.

VIII English summary.

VIII.1. Introduction.

Tissue engineering uses artificial structures that make it possible to organize cells in a 3D structure to improve or replace biological tissues. These matrices are complex in terms of their chemical composition, mechanical properties and their geometry (1-3). Despite the intensive research, the need for innovation and additional research into the application possibilities remains high (4). The objective of this work is to develop new materials that can offer an answer to the wide gap between supply and demand of organs for transplantation by using a new generation of porous hydrogels. Within the present PhD, Pluronic® F127 was applied as a starting material. This is a synthetic block copolymer that consist of a PEO-PPO-PEO structure and is classified in the segment of non-ionic, hydrophobic associating surfactants (119-121). F127 forms a hydrogel in water at physiological temperature and their structural properties are comparable to soft tissue. Pluronic® F127 is approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for use in medical and pharmaceutical systems (149). Current applications include controlled drug delivery (150-153, 164). In this work we focus on the 3D bioplotter device combining hydrogel and rapid prototyping technologies.

VIII.2. Synthesis and characterization of Pluronic® F127 macromonomers.

The physical properties of a Pluronic® F127 hydrogel are not sufficient for most clinical applications due to its limited mechanical stability (198). These are characterized by short *in vivo* residence times. The terminal hydroxyl functions of Pluronic® F127 allows further functionalization. A series of polymerizable Pluronic® F127 derivatives are developed. This with the aim of linking the physical gelation to the benefits of a covalent cross-linked network. Six derivatives are synthesized and characterized including: a

methacrylate, acrylate, amine, acrylamide, thioacetate and a 3-isocyanatopropyltriethoxysilane. The design of the different derivatives can be understood from a point of view of the preliminary *in vitro* cytotoxicity tests. Despite the high viabilities for Pluronic® F127 bismethacrylate, radicals initiated by a UV photo initiator can damage the cells in encapsulation applications. Since the final purpose is the simultaneous plotting of a hydrogel with cells, initiator free systems has been developed. These should allow mild polymerization conditions in combination with cells. Therefore, Pluronic® F127 bithioacetate and bisacrylate were developed to allow different cross-linking strategies via a Michael type reaction. Since Pluronic® F127 bisacrylate shows low viabilities in the cytotoxicity tests, a bisacrylamide derivative was synthesized (via the bisamine) with significantly higher cell viabilities. A final initiator-free system is obtained with Pluronic® F127 3-isocyanatopropyltriethoxysilane, which can be cross-linked after hydrolysis of the ethoxy groups at physiological temperature. The long reaction times for cross-linking under physiological temperature however make these systems unsuitable. All derivatives were characterized by FTIR and ¹H-NMR.

VIII.3. Physico-chemical evaluation of Pluronic® F127 macromonomers.

The physical properties of the hydrogels are inherently connected with the design of a scaffold. The physical gelation must be retained after modification to be able to process the hydrogel via the bioplotter technology. In the first part, the influence of the chemical modification of Pluronic® on the micelle properties is studied. Changing the end group to an apolar function will decrease the cloud point. It can be concluded that the Pluronic® F127 bismethacrylate derivative (BMA) has a cloud point at a lower temperature compared to Pluronic® F127. The thermodynamic parameters (ΔH° , ΔS° and ΔG°) were obtained by determining the critical micelle temperature (CMT). The thermodynamic parameters are not significantly different from each other between a Pluronic® F127 and the BMA derivate. Information about the dimensions of the micelles is obtained by

dynamic light scattering measurements (DLS). Measurements show that the chemical modification of the hydroxyl groups does not result in a significant increase of the micelle diameter. Even after the modification, the micelles occur in a monomodal distribution with an average value of the micelle size of $21 \text{ nm} \pm 1$. They have a comparable maximum and have no significant difference in polydispersity index. The micelle behavior was only studied for the BMA derivative. The gelation behavior in the next step was studied for all the developed derivatives, since it is an important parameter in the final application. Gelation properties are studied via oscillation rheology, differential scanning calorimetry (DSC) and the tube inversion method. It is concluded that a chemical modification of the end group leads to an increase in the gelation temperature for all the derivatives.

Oscillation rheology tests have shown an increase of the gelling temperature of 3 to 4 degrees Celsius for Pluronic[®] F127 BMA. Moreover, the strength of the gels is reduced compared to Pluronic[®] F127. Relying on the sol-gel-sol phase diagrams for Pluronic[®] F127 and BMA, a sharp reduction in the gel-sol transition temperature was observed in addition to an increase in the sol-gel temperature. The chemical modification of the hydroxyl end groups causes a reduction in the thermal stability of the physical hydrogels and causes a reduction of the gel area in the phase diagram. The gelation under physiological conditions are retained for all derivatives. The addition of a sodium chloride solution results in a reduction of the gelation temperature and an increase in gel strength.

VIII.4. Development and characterization of covalently cross-linked Pluronic[®] F127 hydrogels.

Irgacure[®] 2959 can be used as a photo initiator for the UV-initiated radical cross-linking reaction for Pluronic[®] F127 BMA in high gel fractions. The thermo responsive properties are maintained after cross-linking. This can be confirmed by the swelling behavior of the hydrogel. At 20 °C a hydrogel will absorb more water than at 37 °C and at equilibrium it will be 30% higher for a cross linked 30% (g/g) Pluronic[®] F127 BMA. The equilibrium

swelling degree drops from $780\% \pm 10\%$ to $250\% \pm 15\%$ for a 30% (g / g) Pluronic® F127 BMA if the temperature increases from 2 °C to 60 °C. For transplantation purposes, the material must allow a rapid diffusion of nutrients and wastes, as well as for any major metabolic product.

Therefore, the gels were tested for the controlled release of macromolecules such as bovine serum albumin and FITC dextran. The kinetics are driven by the cross linking density and the molecular weight. Two different molecular weights of FITC dextran were investigated as a model; FD40 and FD260. The dextran FD40 exhibits a “burst-release” diffusion pattern, while the dextran FD260 release is delayed from a 30% (w/g) Pluronic® F127 BMA hydrogel. As a model for the release of proteins from hydrogel matrices, bovine serum albumin (BSA) was selected. It was concluded that a lower polymer concentration of Pluronic® F127 BMA results to a faster cumulative release of BSA depending on the incubation time. The presence of an ester-containing reaction partner renders the hydrogel susceptible to hydrolytic degradation. The equilibrium swelling is inversely dependent on the cross linking density, as soon as degradation continues and the ester bond hydrolyzes, the cross linking density will decrease and as a result, the equilibrium swelling will increase.

The free radicals created by the UV photo-initiator process can be toxic. An alternative method has been chosen to develop initiator free cross-linking systems. An alternative way is by a Michael reaction. Despite the fact that Pluronic® F127 bithioacetate can be fully deprotected in DMEM, no consistent hydrogels are obtained after mixing with a commercial acrylic cross linker. An alternative Michael route was investigated whereby Pluronic® F127 bisacrylate is combined with a commercial thiol cross linker, followed by an emulsification step. Consistent hydrogels are obtained with a high gel fraction. The Michael addition reaction is catalyzed in a slightly basic environment and proceeds without the addition of a radical initiator. As a result, cross-linking with cell encapsulation can be performed under mild conditions. Compared to the methacrylate-based systems, hydrogels with much larger sizes (10 cm dimensions) can be obtained with thiol-acrylate monomers.

Another initiator free cross-linking system uses the 3-isocyanatopropyltriethoxysilane derivative of Pluronic® F127. The siloxane groups can undergo an acid or base catalyzed hydrolysis. The reactive silanol groups formed can polymerize by a polycondensation reaction and create a hydrogel. The long reaction times at physiological temperature (20 days) are a major disadvantage and makes it unsuitable for the final application.

An important aspect of the developed hydrogel materials is the mechanical behaviour. The evaluation of this property was done by texturometric evaluations. It can be concluded that hydrogels obtained from macro monomers with a singular terminal functionality (the acrylate and methacrylate derivative) have a lower compression modulus compared to those with a multiple functionality (acrylate-tetrathiol and IPTS).

VIII.5. Development of extracellular matrix mimetic (ECM) structures.

Hydrophilic surfaces exhibit low adsorption of serum protein and low interaction with cells (370, 372). To address these issues, ECM mimetic structures have been developed.

Dopamine is a universal and simple surface modification strategy. Dopamine can be used as a simple one-step surface coating and can undergo self-polymerization in alkaline and aerobic conditions to produce an adherent poly(dopamine) layer on many substrates (407-408). A methacrylamide derivative of dopamine (DAMA) was successfully synthesized and was deposited on a model substrate by dip coating. In this way, double bonds are introduced on the surface that allows further functionalization.

The failure in clinical applications can often be related to thrombosis and stenosis due to a lack of hemocompatibility (482). To mimic a bio membrane surface and to resist non-specific protein adsorption, a polymerizable phosphorylcholine derivative was synthesized, using a five step synthesis procedure; the 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC). In a first step, dip coating will deposit a layer dopamine methacrylamide on a surface. Subsequently, the carbon-carbon double bonds can be copolymerized with MPC.

An alternative way to immobilize MPC on poly(Pluronic® F127 BMA) was obtained via a graft polymerization (grafting-from) with benzophenone. A longer UV irradiation period and a higher amount of adsorbed benzophenone causes a higher concentration of grafted poly (MPC). Pluronic® F127 can also be randomly copolymerized with MPC by a free radical polymerization.

The hydrogels were preliminary tested for their *in vitro* biological behaviour. It was concluded that a chemical modification of Pluronic® F127 only results in a significant difference in cytotoxicity after 24 hours for MC3T3 cells, with the exception of the bisacrylate derivate (low cell viabilities). The cell viability studies have shown that Pluronic® F127 can affect the biological membrane structure. As a result, the use of membrane stabilizing additives is recommended.

VIII.6. Production of 3D scaffolds by using the bioplotter technology.

By using the bioplotter technology, Pluronic® F127 BMA scaffolds can be obtained with perfect, interconnected, porous and cross-linked properties. A bioplotter from SysEng was used, whereby a structure was built up in an X-Y-Z grid. Reproducible scaffolds have been obtained according to a layer-by-layer deposition of hydrogel struts. The pore size varied between 250 and 750 micrometers and the strut diameter between 102 and 406 micrometers. A theoretical, mathematical model for the strut diameter, flow rate and porosity was linked to experimentally obtained values. An alternative polymer processing methodology that was applied includes electrospinning. By applying this method, Pluronic® F127 di-IPTS was successfully deposited on decellularized heart tissue.

VIII.7. Conclusions & future perspectives.

Despite the beneficial properties and excellent potential of Pluronic® F127 hydrogels for soft tissue regeneration, different challenges must be met. The formation of networks under physiological conditions in direct contact with cells and biological molecules is

promising. A combined use with multipotent stem cells that can differentiate into different cell types can make an innovative contribution in this research. The genotoxicity of the materials must be investigated to verify the gene expression pattern of the cells as a function of time. In addition, the main properties of a scaffold such as: swelling, mechanical properties, degradation and diffusion are related to the cross-linked structure of the hydrogel. An important contribution of synthetic hydrogels is the fact that different types of chemistry can be incorporated into the network. A change in the macro monomer concentration in solution or in the functionality of the macro monomer will determine the final gel structure and degradation. Moreover, degradation can be controlled by incorporating hydrolytically or enzymatically labile segments into the hydrogel or by combination with natural biopolymers that are sensitive to enzymatic degradation.

In addition commercial feasibility and up scaling must be considered. To scale up the production of the most promising Pluronic® F127 bisacrylamide, the tosylation and amination step must be further optimized. Reaction times must be shortened to make the synthesis economically viable. It must be taken into account that scaffolds in combination with cells and growth factors are difficult to preserve due to their viability and stability. This aspect makes it advisable to produce scaffolds on demand.

Encapsulating cells in a biodegradable hydrogel opens up many future perspectives, including a simple operation where cells can be easily mixed into the solution prior to gelation. This ensures a uniform distribution of the cells throughout the structure, as well as a highly hydrated tissue-like environment and the ability to develop *in vivo*.

The sensitivity of hydrogels to conventional sterilization methods remains an important point of attention. It is crucial that a biomaterial is resistant to efficient sterilization to get regulatory approval and to proceed safely to clinical trials. One possibility is to use gamma rays, which is very efficient but can be harmful to growth factors. A more appropriate method is to use ethylene oxide gas or an antibacterial filter. The impact of the sterilization methods on the intrinsic properties of the systems has not been adequately studied and further research is recommended.

The key parameters that have been developed in this work for plotting a Pluronic® solution should be tested with encapsulated cells. This may precede the incorporation of extracellular matrix mimetic structures such as MPC. The electrospinning of Pluronic® F127 di-IPTS can be used for micro-encapsulation or as a coating in medical applications. The clinical trials concerning drug delivery systems and as a pharmaceutical ingredient illustrate the broad interest of innovative Pluronic® formulations. Such chemical and biological versatility suggests fundamental advances in the research of Pluronic® hydrogel as a clinical material for tissue engineering.

IX Experimenteel deel.

IX.1. Materialen.

De chemische producten worden als dusdanig gebruikt indien er geen verdere specificaties vermeld worden:

- Pluronic® F127 (MW = 12.700 g/mol PEO₁₀₀-PPO₆₅-PEO₁₀₀) werd ons geschonken door BASF coöperation (Duitsland) en van water ontdaan door een azeotrope Dean-Stark destillatie met toluen.
- Bovine Serum Albumine (Sigma) en FITC dextraan met gemiddeld moleculair gewicht van 38260 en 260000 (Sigma-Aldrich) worden gebruikt voor de vrijstellingsstudies. Commassie Briljant Blue G-250 (Acros) was de basisgrondstof van het Bradford-reagens ter bepaling van de BSA concentratie.
- Fenothiazine werd besteld bij Sigma-Aldrich
- Hydroxy-1-[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanone (Irgacure 2959) werd ons geschonken door Ciba Speciality Chemicals N.V. (Groot-Bijgaarden, België)
- Anhydrisch trimethylamine (TMA) (99%) werd gekocht als een gas bij Sigma Aldrich en gebruikt voor reactie door een kaliumhydroxide trap voor het verwijderen van resterende hoeveelheden water.
- Kaliumpersulfaat (KPS) en 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN) worden gedroogd door conventionele droogtechnieken.
- Fosfortrichloride, propyleenglycol, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) en butyl methacrylaat (BMA) worden opgezuiverd door destillatie.
- De hydrogeloplossingen worden bereid met water van Millipore MilliQ zuiveringssysteem met een geleidbaarheid van 10^{-18} S.cm⁻¹.

IX.2. Overzicht van methoden.

- ^1H en ^{13}C NMR analyses worden uitgevoerd met behulp van een Bruker 300 MHz of Bruker 500 MHz spectrometer. De signalen van de gebruikte solventen voor de preparatie van een NMR staal worden als interne standaard gebruikt.
- Transmissie FTIR spectra worden bekomen met een Bio-Rad 575C spectrometer
- Gelpermeatiechromatografie (GPC) analyse geeft informatie over de moleculaire gewichtsverdeling. Hiervoor wordt gebruikt gemaakt van een GPC systeem van Waters (510) in combinatie met een Plgel 5 μm Mixed-C kolom, ten opzichte van polystyreen standaarden met THF als mobiele fase. Er wordt een flow van 1 ml/min gebruikt. Het gemiddeld moleculair gewicht en polydispersiteit (M_w/M_n) worden bepaald door GPC (Differential Separations Module Waters 2690 met een refractometer detector Waters en Millenium Chromatografie Manager), voor de standaarden maakt men gebruik van polystyreen, met gewichten tussen de 472 en 360.000 Daltons.
- Dynamic Light Scattering metingen worden uitgevoerd met een Malvern 4800 photon correlation spectrometer (PCS) uitgerust met een luchtgekoelde Ar-laser (488 nm). Deze LS is eveneens uitgevoerd met een thermostatisch bad dat metingen bij hogere temperaturen eveneens toelaat.
- Mechanische testen zoals het bepalen van een compressiemodulus en het uitvoeren van een 'Texture Profile Analysis' worden bekomen met behulp van een Lloyd TA500 Texture Analyser met een load cell van 10 N.
- Differential Scanning calorimetry (DSC) scans worden verkregen met een MDSC 2920 (TA instruments).
- UV-absorptie metingen worden bekomen met een UV-Uvikon 810 spectrofotometer (Kontron Instruments, AG Zurich, Switzerland).
- Fluorescentie metingen voor de vrijstelling van FTIC-dextraan worden uitgevoerd met een Spectral Fluorometer SFM25 (Kontron Instruments).

- Reologische parameters worden zowel via oscillatie als flow-reologie worden bekomen met behulp van een Anton Paar MCR 301, uitgerust met een EXFO novacure 2000 UV-lichtbron (max. vermogen: 20 W/cm²).
- UV-irradiatie voor de vernetting van de hydrogelen wordt uitgevoerd met een LWUV lamp (365 nm, intensiteit 5mW/cm²), High Performance Transilluminator (UVP, Inc).
- HPLC analyse wordt uitgevoerd met een Kontron HPLC pomp 420. De detectie gebeurde via een UV HPLC detector type 432 (Kontron Instruments).
- Elektrospinning wordt uitgevoerd met een in huis ontworpen opstelling.
- 3D printing wordt uitgevoerd met een bioplotter van SysEng.
- Statistische analyse wordt uitgevoerd bij het vergelijken van stalen en condities. Significante verschillen worden geïdentificeerd door middel van de student t-test met een confidentie interval van 95%. Excel wordt gebruikt als statistische software en twee waarden worden beschouwd als significant verschillend indien $p < 0.05$.

IX.3. Synthese en karakterisatie van de Pluronic[®] macromonomeren.

IX.3.1. Synthese van Pluronic[®] F127 bismethacrylaat.

Pluronic[®] F127 (250 g, 19.7 mmol) wordt gedroogd in een Dean & Stark droogopstelling door een azeotrope destillatie met 500 ml toluen gedurende 4 uur. De toluen wordt verwijderd aan de rotavapor en de Pluronic[®] F127 wordt heropgelost in 2,5 l droge dichloormethaan. Hieraan voegt men droge triethylamine (22 ml, 158 mmol) toe. Vervolgens voegt men 4-tert-butylcatechol (33 mg, 0.197 mmol) toe als radicaalinhistor, waarna men druppelsgewijs gedistilleerde methacryloylchloride (15.4 ml, 158 mmol) toevoegt (± 1 druppel/5 sec). De reactie wordt uitgevoerd onder stikstof atmosfeer. Na toevoegen laat men de reactie reageren gedurende 18 uur. Het solvent wordt verwijderd aan een rotavapor. Het residu wordt heropgelost in toluen, waardoor

de triethylammoniumhydrochloride zouten neerslaan. Deze zouten worden afgefilterd over celite. Het residu wordt geprecipiteerd in een koud mengsel van 2 l diethylether/pentaaan. Het bekomen precipitaat wordt afgefilterd en gedroogd aan een oliepomp. Men bekomt de Pluronic® F127 bismethacrylaat (BMA) als een wit product (215 g, opbrengstrendement: 84.8%, functionalisatierendement: 85.1%).

IX.3.2. Synthese van Pluronic® F127 bistosylaat.

Droge Pluronic® F127 (50 g, 3.94 mmol) wordt opgelost in 250 ml toluen. Men voegt triethylamine (5.48 ml, 28.3 mmol), DMAP (240 mg, 1.96 mmol) en p.tolueensulfonylchloride toe (7.51 g, 39.40 mmol). Men laat de oplossing reageren gedurende 7 dagen bij kamertemperatuur onder magnetisch roeren. Men filtreert de gevormde zouten af over celite. Men voegt vervolgens 500 ml chloroform toe en wast de organische fase met gedemineraliseerd water (3 x 100 ml, pH = 5.0, verzadigd met NaCl). De organische fase wordt gedroogd met MgSO₄ en wordt nadien ingedampt aan de rotavapor. Men lost het bekomen product op in een weinige hoeveelheid dichloormethaan en precipiteert in een overmaat Et₂O/ hexaan (5:1). Men filtreert het bekomen product af en spoelt na met droge ether en men laat het bekomen product overnacht drogen aan een oliepomp. Men bekomt de Pluronic® F127 bistosylaat als een wit product (27 gr, opbrengstrendement: 52.6%, functionalisatierendement: 92.8%).

IX.3.3. Synthese van Pluronic® F127 bisamine.

Pluronic® F127 bistosylaat (5 g, 0.383 mmol) wordt opgelost in 50 ml MeOH (2.0 M NH₃) onder magnetisch roeren bij kamertemperatuur. Men laat reageren gedurende 3 weken. Bij het reactiemengsel voegt men 50 ml water (verzadigd met NaCl) toe en Na₂CO₃ en roert het geheel tot oplossing. Vervolgens wordt er driemaal geëxtraheerd met CHCl₃ (3 x 50 ml). De gecombineerde organische fasen wordt gedroogd over MgSO₄. Het filtraat wordt vervolgens ingedampt, heropgelost in een weinig dichloormethaan en

geprecipiteerd in een overmaat diethylether/pentaaan (5:1). Men filtreert het product af laat het overnacht drogen aan een oliepomp. Men bekomt het Pluronic® F127 bisamine als een wit product (4.5 g, opbrengstrendement: 92.1%, functionalisatierendement: 99.2 %)

IX.3.4. Synthèse van Pluronic® F127 bisacrylamide.

Droge Pluronic® F127 (10 g, 0.785 mmol) bisamine word opgelost 100 ml droge dichloormethaan. Hieraan voegt men droge triethylamine (0.273 ml, 1.96 mmol) toe. Vervolgens voegt men 4-tert-butylcatechol (13 mg, 0.0785 mmol) toe, waarna me druppelsgewijs acryloylchloride (510 µl, 6.28 mmol) toevoegt (\pm 1 druppel/5 sec). De reactie wordt uitgevoerd onder stikstof atmosfeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur. Het solvent wordt verwijderd aan een rotavapor. Het residu wordt heropgelost in tolueen, waardoor de triethylammoniumhydrochloride zouten neerslaan. Deze zouten worden afgefilterd over celite. Het residu wordt geprecipiteerd in een koud mengsel van 250 ml diethylether/pentaaan. Het bekomen precipitant wordt afgefilterd en gedroogd aan een oliepomp. Men bekomt het Pluronic® F127 bisacrylamide als een wit product (8.2 g, opbrengstrendement: 81.4%, functionalisatierendement: 95.8 %)

IX.3.5. Synthèse van Pluronic® F127 bisthiol.

Droge Pluronic® F127 (25 g, 1.97 mmol) wordt opgelost in 25 ml tolueen in een tweenekkolf en voorzien van een magnetische roerder en een Dean & Stark (vooraf gevuld met tolueen). De oplossing wordt opgewarmd tot 110°C in een oliebad. Mercaptaanzuur (820 µL, 11.81 mmol) en 4 druppels geconcentreerd zwavelzuur wordt aan de oplossing toegevoegd. Na 48 uur laat men de oplossing afkoelen en wordt het volume voor $\frac{1}{4}$ ingedampt en vervolgens 3 x geprecipiteerd in koude diethylether (3 x 500 ml). De vaste fase wordt gescheiden door centrifugeren (25 min, $n = 3800$). Het bekomen product wordt overnacht gedroogd onder vacuüm. Men bekomt het Pluronic® F127 bisthiol als een wit product (8.2 g, opbrengstrendement: 32.6%, functionalisatierendement: 42.0 %)

IX.3.6. Synthese van Pluronic® F127 bithioacetaat.

Droge Pluronic® F127 bistosylaat (27 gr, 2.13 mmol) wordt opgelost in 100 ml DMF in een ronde bodemkolf en het kaliumthioacetaat (0.709, 6.21 mmol) wordt toegevoegd. Men laat de oplossing reageren gedurende 2 dagen (kleuromslag van geel naar rood) onder magnetisch roeren. Het solvent wordt verwijderd aan een rotavapor en men voegt 150 ml gedemineraliseerd water toe. De waterige fase wordt geëxtraheerd met chloroform (3 x 250 ml). De gecombineerde organische fase wordt gedroogd over MgSO₄ en het solvent wordt vervolgens verwijderd aan een rotavapor. Het bekomen product wordt heropgelost in een weinig dichloormethaan en geprecipiteerd in een overmaat diethylether/pentaaan (5:1). Men filtreert het product af, spoelt na met kleine hoeveelheden diethylether en overnacht drogen aan een oliepomp. Men bekomt het Pluronic® F127 bithioacetaat als een wit product (11.5 gr, opbrengstrendement: 42.0%, functionalisatierendement: 100 %)

IX.3.7. Synthese van Pluronic® F127 di-IPTS

Droge Pluronic® F127 (25 g, 1.97 mmol) wordt afgewogen samen met (3-isocyanatopropyl) triethoxysilaan (1.2 g, 4.85 mmol) en 2-ethyl-hexanoaat (0.08 g, 0.247 mmol), dit laat men reageren bij 75 °C gedurende 1 uur onder mechanisch roeren en droge stikstofatmosfeer. Het bekomen product wordt opgelost in chloroform (30 ml) en vervolgens geprecipiteerd in petroleum ether 40-60° (400 ml) en gefilterd. Het bekomen Pluronic® derivaat (F127 di-IPTS) wordt vervolgens meermaals gewassen met porties petroleum ether 40-60° (3 x 100 ml) en gedroogd in vacuum bij kamertemperatuur. Men bekomt het Pluronic® F127 di-IPTS als een wit product (24.5 gr, opbrengstrendement: 94.6%, functionalisatierendement: 92 %).

IX.4. Fysico-chemische evaluatie van Pluronic® macromonomeren.

Alle Pluronic® F127 oplossingen worden aangemaakt via de koude methode van Schmolka. Hiervoor wordt milliQ water in een ijsbad geplaatst. Vervolgens wordt F127 of een F127 derivaat traag toegevoegd bij constant roeren. Alle oplossingen worden aangemaakt volgens een gewicht/gewicht percentage. Na enkele uren roeren bij 0°C wordt het recipiënt in de koelkast geplaatst en laat men dit overnacht oplossen.

IX.4.1. Studie van de miceleringseigenschappen van Pluronic® F127.

Om de CMC versus CMT curve op te stellen wordt de verstrooiingsintensiteit van een luchtgekoelde Ar-laser (488 nm) bepaald onder een hoek van 90° met behulp van een Malvern 4800 photon correlation spectrometer (PCS). Hiervoor wordt een diafragma opening van 150 µm gebruikt. Door thermostatisering van het waterbad waarin de polystyreen cuvetten geplaatst worden, kunnen temperatuursafhankelijke metingen uitgevoerd worden. Om stofpartikels te verwijderen wordt het water, gebruikt voor de polymeeroplossingen, gefilterd door een 0.45 µm PVPP spuitfilter (Alltech, Belgium). Er wordt gebruik gemaakt van tijdsafhankelijke metingen van de verstrooiingsintensiteit. Als hierin een evenwichtswaarde bereikt wordt, wordt de meting beëindigd.

IX.4.2. Bepaling van de miceldiameter door DLS.

De diameter van de micellen wordt bepaald aan de hand van DLS metingen onder een hoek van 90° en een diafragmaopening van 150 nm. Hiervoor worden copolymeeroplossingen bij 37°C gebracht en 3 maal gemeten en geanalyseerd via de CONTIN analysemethode. Voor het aanmaken van de polymeeroplossingen wordt gefiltreerd milliQ water gebruikt. Voor deze metingen worden 1% (g/g) oplossingen, bereid in gedemineraliseerd water, gefilterd door een 0.45 µm filter om het eventueel aanwezige stof te verwijderen.

IX.4.3. Bepaling van de geleringseigenschappen.

IX.4.3.1. Bepaling van het visco-elastisch gedrag met oscillatiereologie.

Het viscoelastisch gedrag van Pluronic® F127 oplossingen (20, 25 en 30% (w/w)) in oplossingen worden uitgevoerd in gedemineraliseerd water bij een frequentie van 3 Hz. De oplossingen worden in hun geltoestand gemeten door het hele systeem te thermostatiseren bij fysiologische temperatuur (37°C).

IX.4.3.2. Bepaling van de sol-gel transitie met behulp van reologie.

De sol-gel transitie van geconcentreerde Pluronic® F127 oplossingen (15-30% (w/w)) worden bepaald aan de hand van een Anton Paar MCR 301 reometer uitgerust met een PP25 (Plate-to-Plate) geometrie. De sol-gel overgang kan geïdentificeerd worden als het punt waar G' en G'' elkaar kruisen. Hiervoor worden G' en G'' gemeten in functie van de temperatuur (opwarmsnelheid: 2°C/min, 2-60°C). De instellingen voor deze metingen worden door frequentieafhankelijke en vervormingsafhankelijke metingen uitgevoerd. Uiteindelijk worden de vaste parameters voor de vervormingshoek, frequentie, tussenruimte en normal force als volgt gekozen: 0.05 mrad, 3 Hz, 300 μ m en 0N.

IX.4.3.3. Bepaling van de sol-gel transitie via DSC.

Het endotherme signaal van de thermoresponsieve PPO-aggregatie wordt bestudeerd met behulp van DSC onder heliumatmosfeer. Hiervoor wordt ± 10 mg van de copolymeer oplossingen bemonsterd in hermetisch aluminium DSC pannetjes geschikt voor vloeistoffen. Deze stalen ondergaan een enkelvoudig temperatuursprogramma van 0°C tot 60°C met een constante opwarmsnelheid van 5°C/min.

IX.4.3.4. Bepaling van de gel-sol transitie via de 'Tube Inversion Method'.

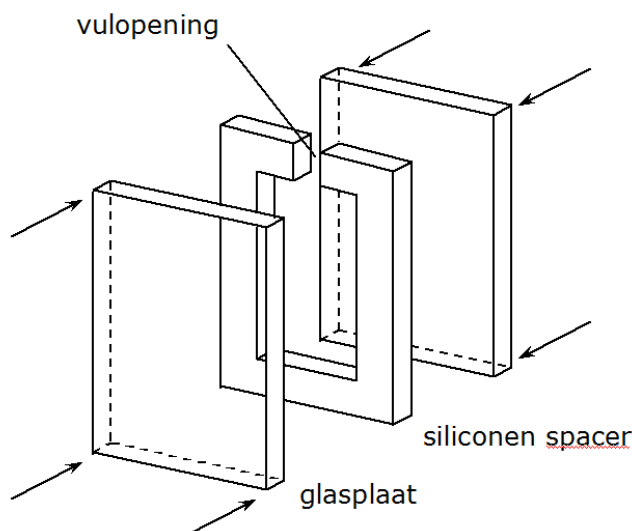
Voor deze test wordt telkens 0.5 g gekoelde (in de sol-toestand) polymeeroplossing in kleine polymerisatiebuisjes (± 5 ml) aangebracht. Vervolgens wordt de nek van de polymerisatiebuisjes dichtgesmolten met behulp van een gasbrander. Deze buisjes worden opgesteld in een dubbelwandig waterbad, waarvan de buitenste mantel aangesloten wordt op een thermostaat/cryostaatbad. De gel-sol temperatuur wordt op deze manier gedefinieerd als de temperatuur waarbij de polymeeroplossing vloeit bij omdraaien van het buisje. Hiervoor wordt er eerst gebruik gemaakt van temperatuursverhogingen van 5°C . Indien de fasentransitie bereikt wordt, wordt hetzelfde experiment herhaald, gebruik makend van een temperatuursinterval van 1°C , zodat er een grotere nauwkeurigheid bekomen wordt. Tussen de temperatuursverhogingen wordt telkens 30 min. gewacht alvorens het buisje om te keren.

IX.5. Ontwikkeling en karakterisatie van covalent vernette Pluronic® F127 hydrogelen.

IX.5.1. Productie van vernette hydrogelen.

Om de hydrogelen te vernetten wordt de foto-initiator Irgacure 2959 oplossing toegevoegd aan de copolymeeroplossing. Dit gebeurt volgens een 1.0 mol% verhouding ten opzichte van de aanwezige dubbele bindingen in oplossing. Omdat de concentratie Irgacure 2959 erg laag is, gecombineerd met de slechte oplosbaarheid ervan in water, wordt het vanuit een stockoplossing (8 mg/ml water toegevoegd). Het volume van de initiatoroplossing die wordt toegevoegd, wordt in rekening gebracht bij het oplossen van het copolymeer in water. Alle initiator bevattende oplossingen worden afgeschermd van het daglicht tot UV bestraling plaatsvindt. Voor fotopolymerisatie worden de precursoroplossingen gekoeld in een ijsbad en met behulp van een injectiespuit met

naald geïnjecteerd in een mal bestaande uit twee glazen platen gescheiden door een 1 mm dikke siliconen spacer (zie Figuur IX.5.1). Deze mal wordt vervolgens tussen twee High Performance Transilluminators gelegd met een lichtintensiteit van 5 mW/cm² en een golflengte van 365 nm (via filter).



Figuur IX.5.1 - Mal voor de bereiding van 1 mm dikke hydrogelfilmen.

IX.5.2. Bepaling van de gelfractie en de zwellingsgraad van de vernette hydrogelen.

Om de evenwichtszwellingsgraad te bepalen worden de hydrogelen na drogen geïncubeerd bij 37°C in een overmaat water en wordt op regelmatige tijdstippen de zwellingsgraad gravimetrisch bepaald tot het evenwicht wordt bereikt volgens de volgende formule:

$$Zwellingsgraad(\%) = \frac{W_{zw} - W_d}{W_d} \cdot 100 \quad [\text{VIII.1}]$$

Waarin W_{zw} en W_d respectievelijk het gewicht voorstellen van het gezwollen en gedroogde monster. Om de oplosbare fractie te scheiden van de onoplosbare worden de hydrogelstalen eerst gedroogd onder vacuüm tot een constant gewicht, waarna ze 48 uur

geëxtraheerd worden via een Soxhlet opstelling met CH₂Cl₂ als solvent. Vervolgens worden de stalen opnieuw gedroogd waarna de gelfractie kan bepaald worden. Deze verhouding wordt gegeven door volgende formule:

$$Gel\text{fractie}(\%) = \frac{W_d^1}{W_d^0} \cdot 100 \quad [\text{VIII.2}]$$

Met W_d^1 : het gewicht van de droge hydrogel na extractie

W_d^0 : het gewicht van de droge hydrogel voor extractie

De gelfractie kan overschat worden door opname van zouten in de hydrogel.

IX.5.3. 'Texture Profile Analysis' (TPA) en de bepaling van de compressiemodulus via texturometrie.

De hydrogelstalen (Ø 3 cm, 1 mm dik) worden aangebracht in het midden van de vlakke onderplaat met ronde uitsnijding (Ø 20 mm). De hydrogelen worden op de plaat gefixeerd door een tweede plaat met gecentreerde opening (Ø 20 mm) boven op de hydrogelen aan te brengen. De metingen worden bij 20°C en in drievoud uitgevoerd.

De hydrogel wordt tweemaal met een cilindrische probe (diameter 3 mm) ingedrukt over een afstand van 3 mm met een snelheid van 20 mm/min.

De compressiemoduli worden bekomen door een eenmalige compressie van 20% uit te voeren met dezelfde probe met een vlakke onderste plaat zonder uitsnijding. De compressiemodulus wordt afgeleid uit de helling van het initieel lineair verband van de kracht in functie van de indrukking. De instrumentparameters van de TPA analyse zijn als volg: test speed: 20 mm/min, trigger: 0.01 N, sample compressed by: 25%, temperature: 37°C. Voor de vermoeidheidstesten worden parameters ingesteld als volgt: test speed: 20 mm/min, trigger, 0.01 N, limit: 500 micron, number of cycles: 20.

IX.5.4. Reologische analyse van de vernette hydrogelen.

De opslagmodulus van de vernette hydrogelschijfjes wordt bepaald met behulp van een tijdsafhankelijke oscillatiereologie bij 25°C op een Anton Paar MCR 301 reometer. Hiervoor wordt er een plate-to-plate geometrie gebruikt met een diameter vergelijkbaar met de hydrogeldiameter. De tussenruimte wordt vastgelegd op 900 μm , de frequentie op 1 Hz en de vervorming op 1%.

IX.5.5. In situ evaluatie van de vernettingsreactie met behulp van foto-reologie.

De fotovernettingsreactie wordt online gevolgd met behulp van de Anton Paar MCR 301 reometer. De parameters voor de oscillatiemetingen zijn identiek zoals deze beschreven worden in paragraaf IX.5.4. In plaats van de PP50 geometrie wordt er gebruik gemaakt van de PP25 en de parallelle bodemplaat wordt vervangen door de UV-optie, die voorzien is van een glazen plaat waaronder een optische kabel (doorsnede 1 cm) gemonteerd kan worden. De optische vezelkabel is op zijn beurt verbonden met een 'EXFO Novacure 2100 spot cure system' die ingesteld wordt op een belichtingstijd van 5 minuten en een intensiteit van $\lambda=10 \text{ W/cm}^2$. Om de vernettingskinetiek te volgen worden 4 oplossingen van 10 to 30% (g/g) F127 BMA bestraald terwijl G' tijdsafhankelijk geregistreerd wordt. Er wordt steeds een Irgacure 2959 concentratie van 0.01% (g/g) gebruikt. Deze experimenten worden isotherm bij 37°C uitgevoerd.

Om de invloed van de fysische gelering op de efficiëntie van de vernettingsreactie na te gaan worden twee experimenten uitgevoerd zoals beschreven in paragraaf IX.6.3 met het verschil dat ze niet isotherm uitgevoerd worden. Telkens wordt gebruik gemaakt van een 25% (g/g) F127 BMA oplossing die 0.01% (g/g) Irgacure 2959 bevat. Bij een eerste experiment wordt de oplossing bestraald met UV licht in de sol toestand, bij een tweede experiment gebeurt dit in de gel toestand. Praktisch ziet het temperatuursprogramma er als volgt uit: gap: 300 μm , frequentie: 3 Hz, deformatiehoek (gekozen op basis van bepaling lineair visco-elastisch gebied): 0.05 mrad; experiment 1: constant

tijdsafhankelijk signaal bij 7 °C, fysische gelling door een temperatuursverhoging met 2°C/min tot 37°C, isotherm tot plateauwaarde, 5 min UV irradiatie, tijdsafhankelijke meting tot plateauwaarde.

IX.5.6. Opstellen van het temperatuursafhankelijk zwellingsdiagramma van Pluronic® F127 BMA.

Het fasendiagramma van vernette hydrogelen kan opgesteld worden door middel van het opstellen van zwelisothermen bij verschillende temperaturen in gedestilleerd water. Alvorens deze test wordt uitgevoerd, wordt de oplosbare fractie uit de hydrogelen verwijderd zoals beschreven in paragraaf (bepaling van de gelfractie en zwellingsgraad van de covalente hydrogelen). Dit om neveneffecten bij overmatige zwelling door aanwezigheid van de oplosbare fractie te vermijden. De zwellingsgraad kan omgerekend worden naar de gewichtsfractie polymeer in de gelen. Deze data worden gebruikt voor het opstellen van het fasendiagramma.

IX.5.7. Ellman's methode voor de kwantitatieve bepaling van vrije thiolen.

De buffer met pH 7.0 bevat 100 mM NaH_2PO_4 (MM = 119.98 g/mol, 3.0 gr) en 0.2 mM EDTA (MM = 372.24 g/mol, 18.6 mg), deze wordt aangepast tot pH 7.0 met NaOH. De buffer met pH 8.2 bevat 100 mM boorzuur (MM = 61.83 g/mol, 1.55 gr) en 0.2 mM EDTA (MM = 372.24 g/mol, 18.6 mg) aangepast tot pH 8.2 met NaOH. Voor het aanmaken van de PBS buffer (1 L) lost men volgende producten toe: NaCl (8.0 gr), KCl (0.20 gr), Na_2HPO_4 (1.44 gr), KH_2PO_4 (0.24 gr), H_2O (800 ml). Men past de pH aan met NaOH tot pH 7.4 en voegt het geheel aan tot 1L.

De stokoplossing van het Ellmans reagens (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoëzuur), CTNB), (10 mM CTNB, \pm 10 mM cystamine) wordt bereid door het suspenderen van 77.1 mg DTNB (\pm 56.3 mg cystamine dihydrochloride) in 25 ml buffer (pH 7.0). De pH wordt aangepast tot 7.0 tot alle DTNB opgelost is. De porties van alle reagentia worden onmiddellijk

ingevroren bij -25°C. Het Ellman/cystamine mengsel kan niet langer gebruikt worden dan 2 uur bij kamertemperatuur.

IX.5.8. Bepalen van de statische contacthoeken op de hydrogelen.

Statische contacthoekmetingen worden uitgevoerd met behulp van een OCA 20 instrument van Dataphysics (Benelux Scientific), uitgerust met een Hamilton spuit (500 µl). Voor elk van de metingen wordt 1 µl dubbel gedestilleerd water op het hydrogelooppervlak gebracht. De substraten worden bekomen door spincoating (5000 rpm, 120 sec, 100 µL) met een oplossing van 5% (g/v) van de hydrogel.

IX.5.9. FITC dextraan vrijstelling.

De vrijstelling van FITC dextraan uit de hydrogelen wordt bestudeerd uit de schijfvormige hydrogelen van F127 BMA (1 mm dik, diameter 9 mm). Deze hydrogelen worden bereid analoog aan de procedure beschreven in paragraaf (aanmaken van vernette hydrogelen), met dat verschil dat in de plaats van zuiver water milliQ water, een 1% (g/g) oplossing FITC dextraan wordt gebruikt en dat de belichtingsduur geminimaliseerd (5 min) wordt om 'photobleaching' van de FITC groepen te vermijden. Twee verschillende dextranen worden gebruikt voor deze studie, gekarakteriseerd door een moleculair gewicht van 38.260 (FD 40) en 260.000 (FD 260). De vrijstellingsstudie wordt in drievoud uitgevoerd in 50 ml fosfaatbuffer bij 37°C in een schudbad. Op vooraf bepaalde tijdstippen wordt 1 ml bemonsterd en steeds vervangen door verse fosfaatbuffer (37°C).

De hoeveelheid FITC dextraan wordt bepaald met fluorescentiespectroscopie bij 495 nm en 505 nm als excitatie- en emissiegolflengte. De fluormeter wordt gekalibreerd met UV bestraalde FITC dextraan in fosfaatbuffer in vergelijkbare omstandigheden als het polymerisatieproces.

IX.5.10. Vrijstelling van BSA.

Hydrogelen worden bereid uitgaande van F127 BMA. Deze polymeren worden opgelost in 0.9% (g/v) NaCl waaraan BSA wordt toegevoegd uit een stockoplossing van 10% (g/g) BSA in 0.9% (g/v) NaCl tot een uiteindelijke concentratie van 0.1% (g/g) is bereikt. 1 mol% Irgacure 2959 (stockoplossing: 8 mg/ml = 35.71 mM) wordt toegevoegd onder constant roeren in een ijsbad. De oplossingen worden via een spuit en injectienaald in een mal aangebracht met een dikte van 1 mm en diameter van 14 mm (gemiddeld gewicht: 317.5 ± 23.6 mg). Deze mallen worden gedurende 10' belicht met een High Performance Transilluminator met een golflengte van 365 nm.

De vrijstelling wordt bewerkstelligd door de incubatie van de gelen in 10 ml aseptisch (0.01% NaN_3) fosfaatbuffer bij 37°C in een schudtoestel (45 tpm; Julabo incubator SW 21). Monsters van 1 ml worden op vooropgestelde tijdstippen genomen en vervangen door verse fosfaatbuffer (37°C). De concentratie BSA in het supernatans wordt bepaald met de Bradford test. Deze calorimetrische methode wordt gebruikt voor de bepaling van de totaalconcentratie van proteïnen in oplossing. Het Bradford reagens wordt bereid door het oplossen van 50 mg Coomassie Blue G 250 in 25 ml ethanol en 50 ml 85% H_3PO_4 . Deze oplossing wordt vervolgens aangelengd tot 500 ml met gedeïoniseerd water. Na bereiding wordt de oplossing afgeschermd van het licht met behulp van aluminiumfolie. Gezien de onstabiliteit van het mengsel wordt het voor elk meetpunt opnieuw aangemaakt en gekalibreerd met BSA in een concentratiegebied van 2.5-25 μg BSA/ml. Voor ieder gebruik wordt de oplossing eveneens gefiltreerd door een 0.22 μm filter (Whitman, Anotop). De bepaling van BSA in het supernatans wordt uitgevoerd met UV-VIS spectroscopie. Voor deze metingen worden PS cuvetten waarin telkens 1 ml Bradford reagens wordt toegevoegd samen met 1 ml van het supernatans. Deze oplossing wordt 10' geïncubeerd bij kamertemperatuur, waarna de absorbantie wordt gemeten bij 595 nm met fosfaatbuffer als blanco (Uvikon XL spectrophotometer, Bio-Tek Instruments).

IX.6. Ontwikkeling van extracellulaire matrix mimetische structuren.

IX.6.1. Beschrijving van de atmosferische druk plasma opstelling.

Twee circulaire koper elektroden ($\varnothing = 4$ cm) worden geplaatst in een cilindrische vat en de elektroden worden bedekt met een keramisch (Al_2O_3) plaat met een dikte van 0.7 mm. De gasspatie tussen de twee keramische platen is 2.5 mm. De bovenste elektrode is aangesloten aan een AC spanningsbron met een frequentie van 50 kHz, de laagste elektrode met de aarde verbonden is met een weerstand van 50 Ω . De aangelegde spanning aan de elektroden wordt gemeten met een hoge spanningsprobe (Tektronix P6015A), waar de ontladingsspanning wordt verkregen door het meten van de spanning over de weerstand van 50 Ω . Deze weerstand kan vervangen worden door een capaciteit van 10 nF en de spanning over deze condensator is proportioneel aan de lading die opgeslagen is op de elektroden. Voor het aanleggen van het plasma wordt er een hydrogelstaal op de onderste plaat gelegd. Na het plaatsen van het staal in de reactor zal de druk in de kamer verlaagd worden tot beneden 0.1 kPa, waarna het gevuld wordt met het werkgas tot een atmosferische druk. Tijdens het plasma proces zal er gas stromen tussen de twee platen. De hoofdstroom aan argon wordt gecontroleerd door een massastroom controller (MKS instruments, Nederland) en kan geregeld worden in het bereik van 0-10 slm (standaard liter per minuut).

De contacthoekmetingen bij plasma behandelingen worden gemeten met een Krüss Easy Drop optisch systeem (Krüss GmbH, Duitsland). Dit systeem is uitgerust met een software die zeer nauwkeurig de druppelgrootte zal controleren. Het beeld van de druppel wordt vervolgens opgeslagen via een monochrome CCD camera die gebruik maakt van een PC gebaseerd dataverwerkingssysteem. Door het gebruik te maken van de computersoftware kan men automatisch de statische contacthoek berekenen. In dit werk maakt men gebruik van gedemineraliseerde waterdruppels van 2 μL als testvloeistof. De waarden van de statische contacthoeken worden bekomen door gebruik

te maken van de Laplace-Young curve en zijn de gemiddelde waarde van acht gemeten waarden.

IX.6.2. Synthese van dopamine methacrylamide.

Men lost natrium boraat (10 g, 49.7 mmol) en 4 gr natrium bicarbonaat (4g, 47.6 mmol) op in 100 ml water voor het bescherming dihydroxy benzeen functies. De waterige oplossing wordt ontgast met Ar gedurende 20 min. Men voegt het 3,4-dihydroxyphenethylamine hydrochloride (5 g, 32.6 mmol) toe aan de oplossing. Vervolgens lost men het methacrylaatanhydride (4.7 ml, 31.7 mmol) op in 25 ml THF. Deze oplossing voegt men druppelsgewijs toe aan de waterige oplossing van het 3,4-dihydroxyphenethylamine hydrochloride. De pH wordt gedurende reactie gecontroleerd. Om het reactiemengsel basisch te houden ($\text{pH} > 8$) voegt men druppelsgewijs een 1M NaOH oplossing toe. Men laat reageren gedurende 14 uur bij kamertemperatuur (met Ar bubbeling). Na reactie vormt er zich een witte slurrie. Men wast de bekomen oplossing tweemaal met ethylacetaat en het resterende product wordt afgefiltreerd. De bekomen oplossing wordt aangezuurd tot pH 2 met een 6M HCl oplossing. De organische fase extraheert men 3 keer van de aangezuurde organische fase met 50 ml ethyl acetaat. De geëxtraheerde lichtbruine organische fase in de ethyl acetate wordt gedroogd over MgSO_4 . De bekomen oplossing wordt gereduceerd tot 25 ml aan de rotavapor. Aan de bekomen oplossing voegt men 250 ml hexaan toe onder stevig roeren. Men bekomt een lichtbruine, vaste stof. Het bekomen product lost men terug op in 20 ml ethylacetaat en precipiteert men in 300 ml hexaan. Het bekomen product wordt overnacht gedroogd. Men bekomt het dopamine methacrylamide als een wit product (4,3 gr, 59.5 %).

IX.6.3. Depositie van dopamine methacrylamide op goud door dipcoating.

Dopamine methacrylamide (22 mg, 0.1 mmol) en dopamine (3 mg, 0.02 mmol) en wordt opgelost in 10 ml Tris-HCl buffer (pH 8.5) De goudsubstraten (1x1 cm) worden ondergedompeld in de oplossing. Na overnachtse coating bij kamertemperatuur wordt het substraat verwijderd en gereinigd met een overmaat water. Men laat drogen onder een argonstroom.

Copolymerisatie met de vinyl getermineerde oppervlakken gaat door door het substraat terug onder te brengen in een ontgaste oplossing van dopamine methacrylamide van 20mM en door het toevoegen van Irgacure 2959 als radicaalinitiator. Vervolgens plaatst men het staal onder een UV bron gedurende 30 min en reinigt men het staal met een overmaat water.

IX.6.4. Synthese en karakterisatie van 2-(methacryloyloxy)ethyl fosforylcholine (PCM).

Stap 1: synthese van ethyleen chlorofosfiet

Aan een oplossing vers gedistilleerd fosfor trichloride (100 g, 0.73 mol) in dichloormethaan (150 ml) wordt er traag het gedistilleerde ethyleen glycol toegevoegd (44.65 g, 0.72 mol) aan zo'n tempo dat de productie van het gas niet buitensporig is. Na volledige toevoeging wordt het mengsel geroerd bij kamertemperatuur gedurende 1 uur, vooraleer het solvent verwijderd wordt door destillatie bij atmosferedruk. Het residu wordt gedestilleerd onder verminderde druk en het chloride wordt gecollecteerd (44.43 g, 48%). Distillatie gebied: 22 – 25°C/0.4 mm Hg; δ_H 4.25 (2H, m, CH₂OP), 4.45 (2H, m, CH₂OP)

Stap 2: synthese van ethyleen diisopropylfosforamidiet

Diisopropylamine (80 g, 0.79 mol) wordt toegevoegd in een druppelsgewijze manier over een periode van 2 uur aan een oplossing van ethyleen chlorofosfiet (20 g, 0.16 mol) in dichloormethaan (250 ml) bij -10 °C onder stikstofatmosfeer. Het reactiemengsel wordt

op kamertemperatuur gebracht en er wordt geroerd gedurende 16 uur. Het mengsel wordt gefiltreerd, ingedampt tot ≈ 150 ml, gekoeld in een ijsbad en dan herfilterd. Het volume wordt verder gereduceerd tot ≈ 75 ml, opnieuw gekoeld en gefiltreerd voor de meeste van de diisopropylammonium chloride te verwijderen. De resterende oplossing wordt gefractioneerd gedistilleerd onder verminderde druk en geeft de ester (28 g, 93%), k_p 44°C/0.15 mm Hg, δ_H (200 MHz; $CDCl_3$) 1.2 (12H, d, J 6 Hz, 4 x Me), 3.45 (2H, m, 2 x CH), 3.9 (2H, m, CH_2OP), 4.1 (2H, m, CH_2OP); m/z (CI) 192 ($M + H^+$)

Stap 3: synthese van ethyleendioxy-2-(methacryloyloxy)ethoxyfosfine

Aan een oplossing van 4,5-dichloorimidazol (7.16 g, 52 mmol) in acetonitrile (80 ml) wordt er een oplossing van 2-hydroxyethyl methacrylaat (7.16 g, 52 mmol) onder een stikstofatmosfeer toegevoegd. Het fosforamidiet (10 g, 52 mmol) wordt dan toegevoegd aan het reactiemengsel en geroerd onder stikstofatmosfeer gedurende 40 min, vervolgens gefiltreerd over Celite voor het verwijderen van de geprecipiteerde vaste deeltjes, waaronder het diisopropylammonium dichloroimidazolide. Het solvent wordt verwijderd onder verminderde druk en levert het fosfiet op en wordt bewaard bij -15°C. δ_H (200 MHz; $CDCl_3$) 1.98 (3H, s, $MeC=C$), 4.0 (4H, m, 2 x CH_2OP), 4.3 (4H, m, 2 x CH_2OP), 5.61 (1H, s, $HC=C$), 6.2 (1H, s, $HC=C$).

Stap 4: synthese van 2-(methacryloyloxy)ethyl fosfaat

Aan het fosfiet (10.9 g, 49 mmol) wordt er druppelsgewijs en onder magnetisch roeren over een periode van 15 min, een oplossing van trimethylamine N-oxide (3.73 g, 49 mmol) in acetonitrile (20 ml) wordt toegevoegd. De heldere oplossing wordt geroerd voor een volgende 40 min. Een staal van de oplossing wordt geëvaporeerd onder verminderde druk voor NMR analyse.

δ_H (200 MHz; $CDCl_3$) 1.98 (3H, s, $MeC=C$), 4.4 (8H, m, 3 x CH_2OP , CH_2O_2C), 5.61 (1H, s, $HC=C$), 6.2 (1H, s, $HC=C$). Dit ruwe product wordt niet verder opgezuiverd voor gebruik in de volgende stap

Stap 5: synthese van 2-methacryloyloxyethylfosforylcholine

Het ethyleenfosfaat (11.3 g, 48 mmol) als een oplossing in acetonitrile (20 ml) en trimethylamine (4.64 g, 75 mmol) worden samen opgewarmd in een gesloten kolf bij 50°C gedurende 48 uur. Het resulterende mengsel wordt warm gefilterd over Celite, en het solvent wordt verwijderd van het filtraat door evaporatie onder verminderde druk. Het product (volume \approx 25 ml) wordt gekoeld tot -20°C gedurende 16 uur, vooraleer het mengsel tot omgevingstemperatuur wordt gebracht. Het vaste precipitaat wordt geïsoleerd door filtratie onder een stikstofatmosfeer en meermaals gewassen met koude acetonitrile (5 ml) en ethyl acetaat (10 ml) en vervolgens gedroogd *in vacuo* over P₂O₅ om het uiteindelijke product te verkrijgen (5.68 g, 37%). Een tweede worp (0.26 g, 1.7%) wordt gerecupereerd uit het filtraat.

δ_{H} (200 MHz; D₂O) 1.97 (3H, s, MeC=C), 3.2 (9H, s, Me₃N⁺), 3.65 (2H, m, CH₂N⁺), 4.15 (2H, m, CH₂OP), 4.3 (2H, m, CH₂OP), 4.4 (2H, m, CH₂OCO), 5.75 (1H, s, HC=C), 6.18 (1H, s, HC=C), m/z

IX.6.5. Immobilisatie van MPC op een oppervlak.

IX.6.5.1. Immobilisatie van een monolaag van dopamine methacrylamide op goud.

Men brengt een DAMA gedipcoate (zie paragraaf IX.6.3) goudstaal onder in een ontgaste oplossing MPC van 0.1 M en door het toevoegen van Irgacure 2959 als radicaalinitiator. Vervolgens plaatst men het staal onder een UV bron gedurende 30 min en reinigt men het staal met een overmaat water.

IX.6.5.2. Immobilisatie via entpolymerisatie van MPC met benzofenon.

Glasplaatjes met doorsnede van 1 cm worden tweemaal gespoeld met methanol in een ultrasoonbad. Vervolgens worden de substraten gespincoat (5000 rpm, 120 sec, 100 μ L) met een oplossing van 5% (g/v) Pluronic[®] F127 BMA en radicaalinitiator Irgacure 2959. De staaltjes worden gedurende 45 min vernet onder UV licht en gewassen met

gedemineraliseerd water en methanol. De staaltjes worden gedroogd onder een argonstroom. Voor het coaten met benzofenon worden de glasplaatjes ondergedompeld in verschillende oplossingen benzofenon in ethanol (15 ml) gedurende 60 sec. Men laat de staaltjes overnacht drogen. Men plaatst de glasplaten in een 24-well plaat en voegt 0.5 ml toe van een 0.5 M MPC oplossing toe in water. Men plaatst de well plaat, afgedekt met een glasplaat, gedurende 1 uur onder UV licht. Men wast de glasplaatjes met water en laat drogen onder argonstroom.

IX.6.6. Bepalen van de hoeveelheid geabsorbeerde benzofenon.

De stalen uit paragraaf IX.6.5.2 worden na het dipcoaten in de benzofenon oplossing geëxtraheerd met ethanol. De concentratie wordt bepaald met behulp van UV spectrophotometrie (UV cuvetten 1 x 1 cm, $\lambda = 251 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{EtOH, benzofenon}} = 3.63 \cdot 10^4 \text{ l/mol}$). De gespincoate stalen worden gedurende verschillende tijdstippen ondergedompeld in een oplossing van benzofenon van 5.0 g/dL en vervolgens geëxtraheerd (na 3 x is alle benzofenon geëxtraheerd) met ethanol (telkens 5 ml).

IX.7. *In vitro* biologische evaluatie.

HFF (humane huid fibroblasten, ATCC), HepG2 (humane leverkankercellijn) en MC3T3 (muis osteoblast cellijn) cellen worden gekweekt in DMEM glutamax medium (Gibco Invitrogen) met 10% foetaal kalfsserum (FCS, Gibco Invitrogen), 2mM L-glutamine (Sigma Aldrich, Belgium), P/S (10 u/ml penicilline, 10 mg/ml streptomycin, Gibco Invitrogen) en 100 mM natrium pyruvaat (Gibco Invitrogen). Cellen worden gekweekt bij 37°C in een bevochtigde atmosfeer van 5% CO₂.

Stockoplossingen (30% (g/g)) worden bereid door het oplossen van het Pluronic[®] derivaat met celmedium overnacht bij 4°C met een magnetische roerder. Cellen worden geïncapsuleerd bij een concentratie van $1.5 \cdot 10^6$ cellen/ml. De finale concentraties van de cel/gel concentraties zijn 15, 12, 9, 6 en 3%. Cellen in medium (0% gel) worden gebruikt

als controle. Na 12 en 24 uur wordt een colometrische MTT analyse, door het gebruik maken van 3-(4, 5-dimethyldiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Merck Promega) voor het uitvoeren van de viabiliteitsstudies van de geïncapsuleerde cellen. De geïncapsuleerde cellen worden overgebracht in epjes en gecentrifugeerd bij 1000 rpm gedurende 5 minuten. De gelen worden verwijderd en vervangen door 0.5 ml (0.5 mg/ml) MTT reagens. Na 4 uur incubatie wordt het MTT reagens verwijderd en vervangen door 0.5 ml lysis buffer (10% Triton X-100 in steriel, gedemineraliseerd water en 1:10 verdund in isopropanol/0.04N HCl) gedurende 30 minuten. 200 µl van de formazan oplossing wordt overgebracht in een 96 well plaat en spectrofotisch gemeten bij 490 nm (EL 800, Biotec Instruments).

De celviabiliteit wordt bepaald door gebruik te maken van Calceine-AM (AnaSpec; 89201)/Propidium Iodide (Sigma-Aldrich; P4170) (Ca/Pi) kleuring. Levende cellen kleuren groen terwijl dode cellen rood gekleurd zijn. De hydrogelstalen worden gereinigd met PBS voor applicatie. Hiervoor wordt 1 ml Ca/Pi oplossingen (2 µl Pi en 2 µl calcein-AM in elke ml PBS) toegevoegd aan de celbeladen hydrogelen. De stalen worden geïncubeerd in het donker gedurende 10 min bij kamertemperatuur. De resultaten worden geanalyseerd door fluorescentie microscopie (Olympus IX 81).

IX.8. Productie van draagstructuren van Pluronic®

IX.8.1. Productie van 3D draagstructuren van Pluronic® F127 BMA met de biplotter.

Fysische hydrogelen worden gebruikt voor het 3D plotten van Pluronic® draagstructuren. Hiervoor wordt een biplotter van SysEng gebruikt. De draagstructuren worden ontworpen zodanig dat ze parallelle struts hebben op elke 0/90 laag. De ruimte tussen de struts is 1 mm en afmetingen van elke laag is 10 x 10 mm. De diameter van de nozzle was 250 µm en de snelheid v_N en de druk waren 1000 mm/sec en 1.0 bar respectievelijk,

gebaseerd op de berekende snelheid. De druk wordt zo laag mogelijk gehouden om celbeschadiging te voorkomen. De pneumatische klep wordt gesloten telkens een rechte strutlijn is vervolledigd en wordt opnieuw geopend wanneer er een nieuwe lijn gevormd wordt. Volgende parameters worden. Druk: 1.0 bar, printsnelheid (xy): 1000 mm/min, printsnelheid (z): 150 mm/min, afzettingsoppervlak: glasplaat, hydrogelconcentratie: 30% (g/g), nozzlediameter: variabel, laagdikte: 0.4 mm, dispensietemperatuur: 20°C, tijd 'preflow'/'postflow': 1 sec. Voor het plotten worden de Pluronic® F127 BMA oplossingen gekoeld beneden hun gellingstemperatuur, waarna ze door een naald op een verwarmde (37°C) plaat in een rastervorm in meerdere lagen aangebracht worden. Na het plotten van de Pluronic® F127 BMA oplossing wordt de volledige matrix vernet met UV licht.

IX.8.2. Elektrospinnen van Pluronic® triethoxysiloxaan.

Voor het elektrospinnen wordt er gebruik gemaakt van een in huis vervaardigd apparaat. Hiervoor worden wegwerpnaalden gebruikt met een interne diameter van 0.6 mm en spuiten (5 ml) die dienen als reservoir voor de macromonomeer oplossingen. De stroomsnelheid wordt gehouden op 4 ml/uur met een toegepaste spanning van 25 kV om een continue stroom te ontwikkelen zonder het breken van de jet. De afstand tussen de naald tip en de collector (15 cm x 15 cm) worden constant gehouden op 25 cm. Het elektrospinnen wordt uitgevoerd onder stabiele condities van temperatuur en relatieve vochtigheid (temperatuur = 21°C, vochtigheid = 30%) gedurende 30 minuten per staal. Vervolgens worden de stalen verwijderd van de collector en gedroogd onder vacuüm gedurende 24 uur.

X Bibliografie.

1. Stock, U. A., and Vacanti, J. P. (2001) Tissue engineering: current state and prospects, *Annu Rev Med* 52, 443-451.
2. Cui, H., Nowicki, M., Fisher, J. P., and Zhang, L. G. (2017) 3D Bioprinting for Organ Regeneration, *Advanced Healthcare Materials* 6.
3. Sohn, S. S., Revuri, V., Nurunnabi, M., Kwak, K. S., and Lee, Y.-k. (2016) Biomimetic and photo crosslinked hyaluronic acid/pluronic F127 hydrogels with enhanced mechanical and elastic properties to be applied in tissue engineering, *Macromolecular Research* 24, 282-291.
4. Yang, W., He, H., and Drueckhammer, D. G. (2001) Computer-Guided Design in Molecular Recognition: Design and Synthesis of a Glucopyranose Receptor., *Angew Chem Int Ed Engl* 40, 1714-1718.
5. Langer, R., and Vacanti, J. P. (1993) Tissue engineering, *Science* 260, 920-926.
6. Fuchs, J. R., Nasser, B. A., and Vacanti, J. P. (2001) Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction, *Ann Thorac Surg* 72, 577-591.
7. Niklason, L. E., and Langer, R. (2001) Prospects for organ and tissue replacement, *JAMA* 285, 573-576.
8. E., B. (2000) *Tissue engineering in perspective.*, 2nd ed., Academic Press.
9. Annual Report of the US Scientific Registry for Transplantation Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network: Transplantation data., US Department of Health and Human Services, Health resources and Services Administration, office of Special Programs, Division of Transplantation, Rockville, MD; United Network for Organ Sharing, Richmond. VA. www.unos.org.
10. optn.transplant.hrsa.gov en OPTN/SRTR jaarlijks rapport.
11. Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., and Chua, C. K. (2001) The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors, *Tissue Eng* 7, 679-689.
12. Woo, J. H., Kim, D. Y., Jo, S. Y., Kang, H., and Noh, I. (2009) Modification of the bulk properties of the porous poly(lactide-co-glycolide) scaffold by irradiation with a cyclotron ion beam with high energy for its application in tissue engineering, *Biomedical Materials* 4, 044101.
13. Thomson, R. C., Wake, M. C., Yaszemski, M. J., and Mikos, A. G. (1995) Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs, *Adv Polym Sci* 122, 245-274.
14. WH Wong, D. M. (1997) *Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering.*
15. JB Park, R. L. *Biomaterials: an introduction.*, 2nd ed., Plenum Press, New York.
16. Lee, K. Y., and Mooney, D. J. (2001) Hydrogels for tissue engineering, *Chem Rev* 101, 1869-1879.
17. Hoffman, A. S. (2002) Hydrogels for biomedical applications, *Adv Drug Deliver Rev* 54, 3-12.
18. Nicodemus, G. D., and Bryant, S. J. (2008) Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications, *Tissue Engineering Part B-Reviews* 14, 149-165.
19. Suh, J. K. F., and Matthew, H. W. T. (2000) Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials* 21, 2589-2598.
20. B Alberts, D. B., J Lewis, M Raff, K Roberts, JD Watson (1994) *Molecular biology of the cell*, 3rd ed., Garland Publishing, New York.
21. Lee, C. H., Singla, A., and Lee, Y. (2001) Biomedical applications of collagen, *Int J Pharm* 221, 1-22.

22. Rault, I., Frei, V., Herbage, D., AbdulMalak, N., and Huc, A. (1996) Evaluation of different chemical methods for cross-linking collagen gel, films and sponges, *J Mater Sci-Mater M* 7, 215-221.
23. Chevallay, B., Abdul-Malak, N., and Herbage, D. (2000) Mouse fibroblasts in long-term culture within collagen three-dimensional scaffolds: Influence of crosslinking with diphenylphosphorylazide on matrix reorganization, growth, and biosynthetic and proteolytic activities, *J Biomed Mater Res* 49, 448-459.
24. Pulapura, S., and Kohn, J. (1992) Trends in the development of bioresorbable polymers for medical applications, *J Biomater Appl* 6, 216-250.
25. Srivastava, S., Gorham, S. D., and Courtney, J. M. (1990) THE ATTACHMENT AND GROWTH OF AN ESTABLISHED CELL-LINE ON COLLAGEN, CHEMICALLY MODIFIED COLLAGEN, AND COLLAGEN COMPOSITE SURFACES, *Biomaterials* 11, 162-168.
26. Kaufmann, P. M., Heimrath, S., Kim, B. S., and Mooney, D. J. (1997) Highly porous polymer matrices as a three-dimensional culture system for hepatocytes, *Cell Transplant* 6, 463-468.
27. Seliktar, D., Black, R. A., Vito, R. P., and Nerem, R. M. (2000) Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro, *Annals of Biomedical Engineering* 28, 351-362.
28. Voytik-Harbin, S. L., Brightman, A. O., Waisner, B. Z., Robinson, J. P., and Lamar, C. H. (1998) Small intestinal submucosa: A tissue-derived extracellular matrix that promotes tissue-specific growth and differentiation of cells in vitro, *Tissue Engineering* 4, 157-174.
29. Silver, F. H., Wang, M.-C., and Pins, G. D. (1995) Preparation and use of fibrin glue in surgery, *Biomaterials* 16, 891-903.
30. Perka, C., Spitzer, R. S., Lindenhayn, K., Sittering, M., and Schultz, O. (2000) Matrix-mixed culture: New methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants, *J Biomed Mater Res* 49, 305-311.
31. Ye, Q., Zund, G., Benedikt, P., Jockenhoevel, S., Hoerstrup, S. P., Sakyama, S., Hubbell, J. A., and Turina, M. (2000) Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering, *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* 17, 587-591.
32. Atala, A., Kim, W., Paige, K. T., Vacanti, C. A., and Retik, A. B. (1994) ENDOSCOPIC TREATMENT OF VESICOUTERETAL REFLUX WITH A CHONDROCYTE-ALGINATE SUSPENSION, *J. Urol.* 152, 641-643.
33. Klock, G., Pfeffermann, A., Ryser, C., Grohn, P., Kuttler, B., Hahn, H. J., and Zimmermann, U. (1997) Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates, *Biomaterials* 18, 707-713.
34. Gombotz, W. R., and Wee, S. F. (1998) Protein release from alginate matrices, *Adv Drug Deliver Rev* 31, 267-285.
35. Smetana, K. (1993) CELL BIOLOGY OF HYDROGELS, *Biomaterials* 14, 1046-1050.
36. Singh, D. K., and Ray, A. R. (2000) Biomedical applications of chitin, chitosan, and their derivatives, *Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics C40*, 69-83.
37. Mi, F. L., Kuan, C. Y., Shyu, S. S., Lee, S. T., and Chang, S. F. (2000) The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release, *Carbohydr Polym* 41, 389-396.
38. Ono, K., Saito, Y., Yura, H., Ishikawa, K., Kurita, A., Akaike, T., and Ishihara, M. (2000) Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive, *J Biomed Mater Res* 49, 289-295.
39. Inukai, M., Jin, Y., Yomota, C., and Yonese, M. (2000) Preparation and characterization of hyaluronate-hydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled release device, *Chem Pharm Bull* 48, 850-854.
40. Afify, A. M., Stern, M., Guntenhoner, M., and Stern, R. (1993) PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN SERUM HYALURONIDASE, *Arch Biochem Biophys* 305, 434-441.
41. Choi, Y. S., Hong, S. R., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., and Nam, Y. S. (1999) Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and

- characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge, *J Biomed Mater Res* 48, 631-639.
42. Duranti, F., Salti, G., Bovani, B., Calandra, M., and Rosati, M. L. (1998) Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation - A clinical and histological study, *Dermatol. Surg.* 24, 1317-1325.
 43. Radomsky, M., Swain, L., Aufdemorte, T., Fox, C., and Poser, J. (1996) Local administration of basic fibroblast growth factor in a hyaluronic acid gel accelerates fracture healing, *J. Bone Miner. Res.* 11, M667-M667.
 44. Kidane, A., Szabocsik, J. M., and Park, K. (1998) Accelerated study on lysozyme deposition on poly(HEMA) contact lenses, *Biomaterials* 19, 2051-2055.
 45. Lu, S. X., and Anseth, K. S. (1999) Photopolymerization of multilaminated poly(HEMA) hydrogels for controlled release, *J Control Release* 57, 291-300.
 46. Oxley, H. R., Corkhill, P. H., Fitton, J. H., and Tighe, B. J. (1993) MACROPOROUS HYDROGELS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS - METHODOLOGY AND MORPHOLOGY, *Biomaterials* 14, 1064-1072.
 47. Heskins, M., and Guillet, J. E. (1968) Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide), *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* 2, 1441-1455.
 48. Stile, R. A., Burghardt, W. R., and Healy, K. E. (1999) Synthesis and characterization of injectable poly(N-isopropylacrylamide)-based hydrogels that support tissue formation in vitro, *Macromolecules* 32, 7370-7379.
 49. Brazel, C. S., and Peppas, N. A. (1996) Pulsatile local delivery of thrombolytic and antithrombotic agents using poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels, *J Control Release* 39, 57-64.
 50. Serres, A., Baudys, M., and Kim, S. W. (1996) Temperature and pH-sensitive polymers for human calcitonin delivery, *Pharmaceutical Research* 13, 196-201.
 51. Zalipsky, S. (1995) FUNCTIONALIZED POLY(ETHYLENE GLYCOL) FOR PREPARATION OF BIOLOGICALLY RELEVANT CONJUGATES, *Bioconjugate Chem* 6, 150-165.
 52. Sofia, S. J., Premnath, V., and Merrill, E. W. (1998) Poly(ethylene oxide) grafted to silicon surfaces: Grafting density and protein adsorption, *Macromolecules* 31, 5059-5070.
 53. Lentz, B. R. (1994) POLYMER-INDUCED MEMBRANE-FUSION - POTENTIAL MECHANISM AND RELATION TO CELL-FUSION EVENTS, *Chem. Phys. Lipids* 73, 91-106.
 54. Dai, W. S., and Barbari, T. A. (1999) Hydrogel membranes with mesh size asymmetry based on the gradient crosslinking of poly(vinyl alcohol), *J Membrane Sci* 156, 67-79.
 55. Bo, J. (1992) STUDY ON PVA HYDROGEL CROSS-LINKED BY EPICHLOROHYDRIN, *J Appl Polym Sci* 46, 783-786.
 56. Kawai, F., and Hu, X. P. (2009) Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation, *Appl Microbiol Biot* 84, 227-237.
 57. Zheng-Qiu, G., Jiu-Mei, X., and Xiang-Hong, Z. (1998) The development of artificial articular cartilage - PVA-hydrogel, *Bio-Med. Mater. Eng.* 8, 75-81.
 58. Burczak, K., Gamian, E., and Kochman, A. (1996) Long-term in vivo performance and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas, *Biomaterials* 17, 2351-2356.
 59. Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., and Shakesheff, K. M. (1999) Polymeric systems for controlled drug release, *Chem Rev* 99, 3181-3198.
 60. Neilson, R. H., and Wisianneilson, P. (1988) POLY(ALKYL/ARYLPHOSPHAZENES) AND THEIR PRECURSORS, *Chem Rev* 88, 541-562.
 61. Allcock, H. R., Pucher, S. R., and Scopelianos, A. G. (1994) POLY (AMINO-ACID-ESTER)PHOSPHAZENES - SYNTHESIS, CRYSTALLINITY, AND HYDROLYTIC SENSITIVITY IN SOLUTION AND THE SOLID-STATE, *Macromolecules* 27, 1071-1075.
 62. Song, S. C., Lee, S. B., Jin, J. I., and Sohn, Y. S. (1999) A new class of biodegradable thermosensitive polymers. I. Synthesis and characterization of

- poly(organophosphazenes) with methoxy-poly(ethylene glycol) and amino acid esters as side groups, *Macromolecules* 32, 2188-2193.
63. Chow, D., Nunalee, M. L., Lim, D. W., Simnick, A. J., and Chilkoti, A. (2008) Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology, *Materials Science & Engineering R-Reports* 62, 125-155.
 64. Yu, M. E., and Deming, T. J. (1998) Synthetic polypeptide mimics of marine adhesives, *Macromolecules* 31, 4739-4745.
 65. Deming, T. J. (2007) Synthetic polypeptides for biomedical applications, *Prog Polym Sci* 32, 858-875.
 66. Badylak, S. E. (2002) The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13, 377-383.
 67. Lim, F. (1984) Microencapsulation of Living Cells and Tissues, *Artif Organs* 8, 112-112.
 68. Creighton, T. (1993) *Proteins: structures and molecular properties.*, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, New York.
 69. Suggs, L. J., and Mikos, A. G. (1999) Development of poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol) as an injectable carrier for endothelial cells, *Cell Transplant* 8, 345-350.
 70. He, S. L., Yaszemski, M. J., Yasko, A. W., Engel, P. S., and Mikos, A. G. (2000) Injectable biodegradable polymer composites based on poly(propylene fumarate) crosslinked with poly(ethylene glycol)-dimethacrylate, *Biomaterials* 21, 2389-2394.
 71. Anseth, K. S., Bowman, C. N., and BrannonPeppas, L. (1996) Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination, *Biomaterials* 17, 1647-1657.
 72. Smidsrod, O., and Skjakbraek, G. (1990) Alginate as Immobilization Matrix for Cells, *Trends Biotechnol* 8, 71-78.
 73. Lee, K. Y., Rowley, J. A., Eiselt, P., Moy, E. M., Bouhadir, K. H., and Mooney, D. J. (2000) Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density, *Macromolecules* 33, 4291-4294.
 74. Bryant, S. J., and Anseth, K. S. (2002) Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels, *J Biomed Mater Res* 59, 63-72.
 75. LeRoux, M. A., Guilak, F., and Setton, L. A. (1999) Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration, *J Biomed Mater Res* 47, 46-53.
 76. Bouhadir, K. H., Lee, K. Y., Alsberg, E., Damm, K. L., Anderson, K. W., and Mooney, D. J. (2001) Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering, *Biotechnol Progr* 17, 945-950.
 77. Stewart, W. W., and Swaisgood, H. E. (1993) Characterization of Calcium Alginate Pore Diameter by Size-Exclusion Chromatography Using Protein Standards, *Enzyme Microb Tech* 15, 922-927.
 78. Lu, S. X., and Anseth, K. S. (2000) Release behavior of high molecular weight solutes from poly(ethylene glycol)-based degradable networks, *Macromolecules* 33, 2509-2515.
 79. JL West, J. H. (1997) Synthetic biodegradable polymer scaffolds, pp 83-95, Boston.
 80. Nuttelman, C. R., Mortisen, D. J., Henry, S. M., and Anseth, K. S. (2001) Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration, *J Biomed Mater Res* 57, 217-223.
 81. Mann, B. K., Gobin, A. S., Tsai, A. T., Schmedlen, R. H., and West, J. L. (2001) Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering, *Biomaterials* 22, 3045-3051.
 82. Rowley, J. A., Madlambayan, G., and Mooney, D. J. (1999) Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials, *Biomaterials* 20, 45-53.

83. Alsberg, E., Anderson, K. W., Albeiruti, A., Franceschi, R. T., and Mooney, D. J. (2001) Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering, *J Dent Res* 80, 2025-2029.
84. Mann, B. K., Schmedlen, R. H., and West, J. L. (2001) Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells, *Biomaterials* 22, 439-444.
85. Hern, D. L., and Hubbell, J. A. (1998) Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing, *J Biomed Mater Res* 39, 266-276.
86. Suzuki, Y., Tanihara, M., Suzuki, K., Saitou, A., Sufan, W., and Nishimura, Y. (2000) Alginate hydrogel linked with synthetic oligopeptide derived from BMP-2 allows ectopic osteoinduction in vivo, *J Biomed Mater Res* 50, 405-409.
87. Elisseeff, J., McIntosh, W., Fu, K., Blunk, B. T., and Langer, R. (2001) Controlled-release of IGF-I and TGF-beta1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering, *J Orthop Res* 19, 1098-1104.
88. Fitzsimmons, R. E. B., Aquilino, M. S., Quigley, J., Chebotarev, O., Tarlan, F., and Simmons, C. A. (2018) Generating vascular channels within hydrogel constructs using an economical open-source 3D bioprinter and thermoreversible gels, *Bioprinting* 9, 7-18.
89. Sarker, M. D., Naghieh, S., Sharma, N. K., and Chen, X. (2018) 3D biofabrication of vascular networks for tissue regeneration: A report on recent advances, *Journal of Pharmaceutical Analysis* 8, 277-296.
90. Raymond, S., Maazouz, Y., Montufar, E. B., Perez, R. A., González, B., Konka, J., Kaiser, J., and Ginebra, M.-P. (2018) Accelerated hardening of nanotextured 3D-plotted self-setting calcium phosphate inks, *Acta Biomaterialia* 75, 451-462.
91. Yeong, W. Y., Chua, C. K., Leong, K. F., and Chandrasekaran, M. (2004) Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential, *Trends Biotechnol* 22, 643-652.
92. Schmeichel, K. L., and Bissell, M. J. (2003) Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions, *Journal of Cell Science* 116, 2377-2388.
93. Cidonio, G., Glinka, M., Dawson, J. I., and Oreffo, R. O. C. (2019) The cell in the ink: Improving biofabrication by printing stem cells for skeletal regenerative medicine, *Biomaterials* 209, 10-24.
94. Dutta, R. C., and Dutta, A. K. (2009) Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications, *Biotechnology Advances* 27, 334-339.
95. Kirkpatrick, C. J., Fuchs, S., Hermanns, M. I., Peters, K., and Unger, R. E. (2007) Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine, *Biomaterials* 28, 5193-5198.
96. Hutmacher, D. W., and Cool, S. (2007) Concepts of scaffold-based tissue engineering-the rationale to use solid free-form fabrication techniques, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11, 654-669.
97. Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G., and Markwald, R. R. (2003) Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering, *Trends Biotechnol* 21, 157-161.
98. Peltola, S. M., Melchels, F. P. W., Grijpma, D. W., and Kellomaki, M. (2008) A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes, *Ann Med* 40, 268-280.
99. Desmet, T., Schacht, E., and Dubruel, P. (2008) Rapid prototyping as an elegant production tool for polymeric tissue engineering scaffolds: a review, In *Tissue Engineering: Roles, Materials and Applications* (Barnes, S. J., and Harris, L. P., Eds.), Nova Science Publishers.
100. Ma, P. X. (2004) Scaffolds for tissue fabrication, *Materials Today* 7, 30-40.
101. Sachlos, E., and Czernuszka, J. T. (2003) Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds, *Eur Cell Mater* 5, 29-39; discussion 39-40.

102. Roach, P., Eglin, D., Rohde, K., and Perry, C. C. (2007) Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications, *J Mater Sci-Mater M* 18, 1263-1277.
103. Azuma, K., Nagaoka, M., Cho, C. S., and Akaike, T. (2009) An artificial extracellular matrix created by hepatocyte growth factor fused to IgG-Fc, *Biomaterials* 31, 802-809.
104. Hubbell, J. A. (1999) Bioactive biomaterials, *Curr Opin Biotech* 10, 123-129.
105. Chu, P. K., Chen, J. Y., Wang, L. P., and Huang, N. (2002) Plasma-surface modification of biomaterials, *Materials Science & Engineering R-Reports* 36, 143-206.
106. Desmet, T., Morent, R., De Geyter, N., Leys, C., Schacht, E., and Dubrueil, P. (2009) Nonthermal Plasma Technology as a Versatile Strategy for Polymeric Biomaterials Surface Modification: A Review, *Biomacromolecules* 10, 2351-2378.
107. Liu, X. H., and Ma, P. X. (2009) Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds, *Biomaterials* 30, 4094-4103.
108. Nichols, M. D., Scott, E. A., and Elbert, D. L. (2009) Factors affecting size and swelling of poly(ethylene glycol) microspheres formed in aqueous sodium sulfate solutions without surfactants, *Biomaterials* 30, 5283-5291.
109. Mironov, V., Kasyanov, V., Shu, X. Z., Eisenberg, C., Eisenberg, L., Gonda, S., Trusk, T., Markwald, R. R., and Prestwich, G. D. (2005) Fabrication of tubular tissue constructs by centrifugal casting of cells suspended in an in situ crosslinkable hyaluronan-gelatin hydrogel, *Biomaterials* 26, 7628-7635.
110. Pitarresi, G., Palumbo, F. S., Calabrese, R., Craparo, E. F., and Giammona, G. (2008) Crosslinked hyaluronan with a protein-like polymer: Novel bioresorbable films for biomedical applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 84A, 413-424.
111. Farrell, E., O'Brien, F. J., Doyle, P., Fischer, J., Yannas, I., Harley, B. A., O'Connell, B., Prendergast, P. J., and Campbell, V. A. (2006) A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes, *Tissue Engineering* 12, 459-468.
112. Wang, X. H., Yan, Y. N., and Zhang, R. J. (2010) Recent Trends and Challenges in Complex Organ Manufacturing, *Tissue Engineering Part B-Reviews* 16, 189-197.
113. Estelles, J. M., Vidaurre, A., Duenas, J. M. M., and Cortazar, I. C. (2008) Physical characterization of polycaprolactone scaffolds, *J Mater Sci-Mater M* 19, 189-195.
114. Bercea, M., Morariu, S., Nita, L., and Darie, R. (2014) Investigation of Poly(vinyl alcohol)/Pluronic F127 Physical Gels, *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 53, 1354-1361.
115. Lee, J., Cuddihy, M. J., and Kotov, N. A. (2008) Three-dimensional cell culture matrices: State of the art, *Tissue Engineering Part B-Reviews* 14, 61-86.
116. Chua, C. K., Leong, K. F., and Lim, C. S. (2004) *Rapid Prototyping: Principles and Applications*, 2nd ed., World Scientific
117. Cheng, J., Lin, F., Liu, H. X., Yan, Y. N., Wang, X. H., Zhang, R., and Xiong, Z. (2008) Rheological properties of cell-hydrogel composites extruding through small-diameter tips, *Journal of Manufacturing Science and Engineering-Transactions of the Asme* 130, 021014.
118. Gao, B., Yang, Q., Zhao, X., Jin, G., Ma, Y., and Xu, F. (2016) 4D Bioprinting for Biomedical Applications, *Trends Biotechnol* 34, 746-756.
119. Wu, C.-J., Gaharwar, A. K., Chan, B. K., and Schmidt, G. (2011) Mechanically Tough Pluronic F127/Laponite Nanocomposite Hydrogels from Covalently and Physically Cross-Linked Networks, *Macromolecules* 44, 8215-8224.
120. Gwon, K., Jo, E.-J., Sahu, A., Lee, J. Y., Kim, M.-G., and Tae, G. (2018) Improved near infrared-mediated hydrogel formation using diacrylated Pluronic F127-coated upconversion nanoparticles, *Materials Science and Engineering: C* 90, 77-84.
121. Schmolka, I. R. (1977) Review of Block Polymer Surfactants, *J Am Oil Chem Soc* 54, 110-116.
122. Schmolka, I. R. (1984) Gel Cosmetics, *Cosmet Toiletries* 99, 69-&.

123. F.M. Winnik, M. P. B. a. W. R. (1992) U.S. Patent 5,139,574
124. F.M Winnik, A. R. D., J.W.-P. Lin and M.D. Croucher. (1992) U.S. Patent 5,139,574
125. Zeng, Z., Peng, Z., Chen, L., and Chen, Y. (2014) Facile fabrication of thermally responsive Pluronic F127-based nanocapsules for controlled release of doxorubicin hydrochloride, *Colloid Polym Sci* 292, 1521-1530.
126. Zhang, W., Gilstrap, K., Wu, L., K. C, R. B., Moss, M. A., Wang, Q., Lu, X., and He, X. (2010) Synthesis and Characterization of Thermally Responsive Pluronic F127–Chitosan Nanocapsules for Controlled Release and Intracellular Delivery of Small Molecules, *ACS Nano* 4, 6747-6759.
127. Kawashima, Y., Handa, T., Kasai, A., Takenaka, H., and Lin, S. Y. (1985) The Effects of Thickness and Hardness of the Coating Film on the Drug Release Rate of Theophylline Granules Coated with Chitosan Sodium Tripolyphosphate Complex, *Chem Pharm Bull* 33, 2469-2474.
128. Guzman, M., Garcia, F. F., Molpeceres, J., and Aberturas, M. R. (1992) Polyoxyethylene-Polyoxypropylene Block Copolymer Gels as Sustained-Release Vehicles for Subcutaneous Drug Administration, *Int J Pharm* 80, 119-127.
129. Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., Meliknubarov, N. S., Fedoseev, N. A., Dorodnich, T. Y., Alakhov, V. Y., Chekhonin, V. P., Nazarova, I. R., and Kabanov, V. A. (1992) A New Class of Drug Carriers - Micelles of Poly(Oxyethylene)-Poly(Oxypropylene) Block Copolymers as Microcontainers for Drug Targeting from Blood in Brain, *J Control Release* 22, 141-157.
130. Kant, V., Gopal, A., Kumar, D., Gopalkrishnan, A., Pathak, N. N., Kurade, N. P., Tandan, S. K., and Kumar, D. (2014) Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats, *Acta Histochemica* 116, 5-13.
131. Schanuel, F. S., Raggio Santos, K. S., Monte-Alto-Costa, A., and de Oliveira, M. G. (2015) Combined nitric oxide-releasing poly(vinyl alcohol) film/F127 hydrogel for accelerating wound healing, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 130, 182-191.
132. Henry, R. L., and Schmolka, I. R. (1989) Burn Wound Coverings and the Use of Poloxamer Preparations, *Crit Rev Biocompat* 5, 207-220.
133. Tanford, C. (1973) *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, J. Wiley & Sons, New York.
134. Privalov, P. L., and Gill, S. J. (1989) The Hydrophobic Effect - a Reappraisal, *Pure Appl Chem* 61, 1097-1104.
135. Pluronic and Tetronic surfactants, Technical Brochure, BASF corp., Parsippany, NJ, 1989.
136. Teotia, A. K., Sami, H., and Kumar, A. (2015) 1 - Thermo-responsive polymers: structure and design of smart materials, In *Switchable and Responsive Surfaces and Materials for Biomedical Applications* (Zhang, Z., Ed.), pp 3-43, Woodhead Publishing, Oxford.
137. Brown, W., Schillen, K., Almgren, M., Hvidt, S., and Bahadur, P. (1991) Micelle and Gel Formation in a Poly(Ethylene Oxide) Poly(Propylene Oxide) Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymer in Water Solution - Dynamic and Static Light-Scattering and Oscillatory Shear Measurements, *J Phys Chem-Us* 95, 1850-1858.
138. Wanka, G., Hoffmann, H., and Ulbricht, W. (1990) The Aggregation Behavior of Poly-(Oxyethylene)-Poly-(Oxypropylene)-Poly-(Oxyethylene)-Block-Copolymers in Aqueous-Solution, *Colloid Polym Sci* 268, 101-117.
139. Yu, G. E., Deng, Y. L., Dalton, S., Wang, Q. G., Attwood, D., Price, C., and Booth, C. (1992) Micellization and Gelation of Triblock Copoly(Oxyethylene Oxypropylene Oxyethylene), F127, *J Chem Soc Faraday T* 88, 2537-2544.
140. Wang, P., and Johnston, T. P. (1991) Kinetics of Sol-to-Gel Transition for Poloxamer Polyols, *J Appl Polym Sci* 43, 283-292.
141. Schmolka, I. R. (1991) A Comparison of Block Copolymer Surfactant Gels, *J Am Oil Chem Soc* 68, 206-209.

142. Alexandridis, P., Holzwarth, J. F., and Hatton, T. A. (1994) Micellization of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Aqueous-Solutions - Thermodynamics of Copolymer Association, *Macromolecules* 27, 2414-2425.
143. Rassing, J., and Attwood, D. (1982) Ultrasonic Velocity and Light-Scattering-Studies on the Polyoxyethylene Polyoxypropylene Co-Polymer Pluronic-F127 in Aqueous-Solution, *Int J Pharm* 13, 47-55.
144. Mortensen, K., and Pedersen, J. S. (1993) Structural Study on the Micelle Formation of Poly(Ethylene Oxide) Poly(Propylene Oxide) Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymer in Aqueous-Solution, *Macromolecules* 26, 805-812.
145. Vadnere, M., Amidon, G., Lindenbaum, S., and Haslam, J. L. (1984) Thermodynamic Studies on the Gel Sol Transition of Some Pluronic Polyols, *Int J Pharm* 22, 207-218.
146. Matthew, J. E., Nazario, Y. L., Roberts, S. C., and Bhatia, S. R. (2002) Effect of mammalian cell culture medium on the gelation properties of Pluronic((R)) F127, *Biomaterials* 23, 4615-4619.
147. Li, C., Palmer, W. K., and Johnston, T. P. (1996) Disposition of poloxamer 407 in rats following a single intraperitoneal injection assessed using a simplified colorimetric assay, *J Pharm Biomed Anal* 14, 659-665.
148. Singh-Joy, S. D., and McLain, V. C. (2008) Safety assessment of poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, poloxamer 105 benzoate, and poloxamer 182 dibenzoate as used in cosmetics, *Int J Toxicol* 27 Suppl 2, 93-128.
149. Liaw, J., and Lin, Y. C. (2000) Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl, *J Control Release* 68, 273-282.
150. Dumortier, G., Grossiord, J. L., Agnely, F., and Chaumeil, J. C. (2006) A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics, *Pharm Res* 23, 2709-2728.
151. Escobar-Chavez, J. J., Lopez-Cervantes, M., Naik, A., Kalia, Y. N., Quintanar-Guerrero, D., and Ganem-Quintanar, A. (2006) Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations, *J Pharm Pharm Sci* 9, 339-358.
152. Fakhar Ud, D., and Khan, G. M. (2019) Development and characterisation of levosulpiride-loaded suppositories with improved bioavailability in vivo, *Pharm Dev Technol* 24, 63-69.
153. Monti, D., Burgalassi, S., Rossato, M. S., Albertini, B., Passerini, N., Rodriguez, L., and Chetoni, P. (2010) Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part II: In vitro/in vivo evaluation, *Int J Pharm* 400, 32-36.
154. Almeida, H., Amaral, M. H., Lobao, P., and Lobo, J. M. (2012) Pluronic(R) F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs, *J Pharm Pharm Sci* 15, 592-605.
155. Chiappetta, D. A., and Sosnik, A. (2007) Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs, *Eur J Pharm Biopharm* 66, 303-317.
156. Shin, S. C., and Cho, C. W. (1997) Physicochemical characterizations of piroxicam-poloxamer solid dispersion, *Pharm Dev Technol* 2, 403-407.
157. Chutimaworapan, S., Ritthidej, G. C., Yonemochi, E., Oguchi, T., and Yamamoto, K. (2000) Effect of water-soluble carriers on dissolution characteristics of nifedipine solid dispersions, *Drug Dev Ind Pharm* 26, 1141-1150.
158. Miyazaki, S., Ohkawa, Y., Takada, M., and Attwood, D. (1992) Antitumor Effect of Pluronic F-127 Gel Containing Mitomycin C on Sarcoma-180 Ascites Tumor in Mice, *Chem Pharm Bull* 40, 2224-2226.

159. Morikawa, K., Okada, F., Hosokawa, M., and Kobayashi, H. (1987) *Enhancement of therapeutic effects of recombinant interleukin 2 on a transplantable rat fibrosarcoma by the use of a sustained release vehicle*, Vol. 47.
160. Ricci, E. J., Bentley, M. V., Farah, M., Bretas, R. E., and Marchetti, J. M. (2002) Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels, *Eur J Pharm Sci* 17, 161-167.
161. Ricci, E. J., Lunardi, L. O., Nanclares, D. M., and Marchetti, J. M. (2005) Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels, *Int J Pharm* 288, 235-244.
162. Xuan, J. J., Balakrishnan, P., Oh, D. H., Yeo, W. H., Park, S. M., Yong, C. S., and Choi, H. G. (2010) Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam, *Int J Pharm* 395, 317-323.
163. Bansal, M., Mittal, N., Yadav, S. K., Khan, G., Gupta, P., Mishra, B., and Nath, G. (2018) Periodontal thermoresponsive, mucoadhesive dual antimicrobial loaded in-situ gel for the treatment of periodontal disease: Preparation, in-vitro characterization and antimicrobial study, *J Oral Biol Craniofac Res* 8, 126-133.
164. Almeida, H., Amaral, M. H., Lobao, P., and Sousa Lobo, J. M. (2013) Applications of poloxamers in ophthalmic pharmaceutical formulations: an overview, *Expert Opin Drug Deliv* 10, 1223-1237.
165. Arranja, A., Denkova, A. G., Morawska, K., Waton, G., van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schosseler, F., and Mendes, E. (2016) Interactions of Pluronic nanocarriers with 2D and 3D cell cultures: Effects of PEO block length and aggregation state, *J Control Release* 224, 126-135.
166. Akash, M. S. H., Rehman, K., and shuqing, c. (2014) Pluronic F127-Based Thermosensitive Gels for Delivery of Therapeutic Proteins and Peptides, *Polymer Reviews* 54.
167. Akash, M. S. H., and Rehman, K. (2015) Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 209.
168. Moreno, E., Schwartz, J., Larraneta, E., Nguewa, P. A., Sanmartin, C., Agueros, M., Irache, J. M., and Espuelas, S. (2014) Thermosensitive hydrogels of poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) - Pluronic((R)) F127 copolymers for controlled protein release, *Int J Pharm* 459, 1-9.
169. Batrakova, E. V., and Kabanov, A. V. (2008) Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers, *J Control Release* 130, 98-106.
170. Choi, H.-G., Jung, J.-H., Ryu, J.-M., Yoon, S.-J., Oh, Y.-K., and Kim, C.-K. (1998) Development of In situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository, *Int J Pharm* 165, 33-44.
171. Choi, H., Lee, M., Kim, M., and Kim, C. (1999) Effect of additives on the physicochemical properties of liquid suppository bases, *Int J Pharm* 190, 13-19.
172. Ryu, J. M., Chung, S. J., Lee, M. H., Kim, C. K., and ShimCk. (1999) Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum, *J Control Release* 59, 163-172.
173. Yuan, Y., Cui, Y., Zhang, L., Zhu, H. P., Guo, Y. S., Zhong, B., Hu, X., Wang, X. H., and Chen, L. (2012) Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide, *Int J Pharm* 430, 114-119.
174. Koffi, A. A., Agnely, F., Ponchel, G., and Grossiord, J. L. (2006) Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine, *Eur J Pharm Sci* 27, 328-335.
175. Park, Y. J., Yong, C. S., Kim, H. M., Rhee, J. D., Oh, Y. K., Kim, C. K., and Choi, H. G. (2003) Effect of sodium chloride on the release, absorption and safety of diclofenac sodium delivered by poloxamer gel, *Int J Pharm* 263, 105-111.

176. Kim, C.-K., Lee, S.-W., Choi, H.-G., Lee, M.-K., Gao, Z.-G., Kim, I.-S., and Park, K.-M. (1998) Trials of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository in human subjects, *Int J Pharm* 174, 201-207.
177. Liu, Y., Wang, X., and Di, X. (2018) Thermosensitive In Situ Gel Based on Solid Dispersion for Rectal Delivery of Ibuprofen, *AAPS PharmSciTech* 19, 338-347.
178. Moawad, F. A., Ali, A. A., and Salem, H. F. (2017) Nanotransfersomes-loaded thermosensitive in situ gel as a rectal delivery system of tizanidine HCl: preparation, in vitro and in vivo performance, *Drug Deliv* 24, 252-260.
179. Yeo, W. H., Ramasamy, T., Kim, D. W., Cho, H. J., Kim, Y. I., Cho, K. H., Yong, C. S., Kim, J. O., and Choi, H. G. (2013) Docetaxel-loaded thermosensitive liquid suppository: optimization of rheological properties, *Arch Pharm Res* 36, 1480-1486.
180. Shastri, D. H., Prajapati, S. T., and Patel, L. D. (2010) Thermoreversible mucoadhesive ophthalmic in situ hydrogel: Design and optimization using a combination of polymers, *Acta Pharm* 60, 349-360.
181. Gratieri, T., Gelfuso, G. M., Rocha, E. M., Sarmiento, V. H., de Freitas, O., and Lopez, R. F. (2010) A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery, *Eur J Pharm Biopharm* 75, 186-193.
182. Lin, H. R., Sung, K. C., and Vong, W. J. (2004) In situ gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine, *Biomacromolecules* 5, 2358-2365.
183. Yu, S., Zhang, X., Tan, G., Tian, L., Liu, D., Liu, Y., Yang, X., and Pan, W. (2017) A novel pH-induced thermosensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer cross-linked by glutaraldehyde for ophthalmic drug delivery, *Carbohydr Polym* 155, 208-217.
184. Dewan, M., Sarkar, G., Bhowmik, M., Das, B., Chattoapadhyay, A. K., Rana, D., and Chattopadhyay, D. (2017) Effect of gellan gum on the thermogelation property and drug release profile of Poloxamer 407 based ophthalmic formulation, *Int J Biol Macromol* 102, 258-265.
185. Khan, S., Warade, S., and Singhavi, D. J. (2018) Improvement in Ocular Bioavailability and Prolonged Delivery of Tobramycin Sulfate Following Topical Ophthalmic Administration of Drug-Loaded Mucoadhesive Microparticles Incorporated in Thermosensitive In Situ Gel, *J Ocul Pharmacol Ther* 34, 287-297.
186. Mayol, L., Quaglia, F., Borzacchiello, A., Ambrosio, L., and La Rotonda, M. I. (2008) A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: rheological, mucoadhesive and in vitro release properties, *Eur J Pharm Biopharm* 70, 199-206.
187. Cho, H. J., Balakrishnan, P., Park, E. K., Song, K. W., Hong, S. S., Jang, T. Y., Kim, K. S., Chung, S. J., Shim, C. K., and Kim, D. D. (2011) Poloxamer/cyclodextrin/chitosan-based thermoreversible gel for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride, *J Pharm Sci* 100, 681-691.
188. Mura, P., Mennini, N., Nativi, C., and Richichi, B. (2018) In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin, *Eur J Pharm Biopharm* 122, 54-61.
189. Altuntas, E., and Yener, G. (2017) Formulation and Evaluation of Thermoreversible In Situ Nasal Gels Containing Mometasone Furoate for Allergic Rhinitis, *AAPS PharmSciTech* 18, 2673-2682.
190. Sridhar, V., Wairkar, S., Gaud, R., Bajaj, A., and Meshram, P. (2018) Brain targeted delivery of mucoadhesive thermosensitive nasal gel of selegiline hydrochloride for treatment of Parkinson's disease, *J Drug Target* 26, 150-161.
191. Chang, J., Oh, Y., Choi, H.-g., Kim, Y., and Kim, C.-K. (2002) Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions, *Int J Pharm* 241, 155-163.
192. Mirza, M. A., Panda, A. K., Asif, S., Verma, D., Talegaonkar, S., Manzoor, N., Khan, A., Ahmed, F. J., Dudeja, M., and Iqbal, Z. (2016) A vaginal drug delivery model, *Drug Deliv* 23, 3123-3134.
193. Rencber, S., Karavana, S. Y., Senyigit, Z. A., Erac, B., Limoncu, M. H., and Baloglu, E. (2017) Mucoadhesive in situ gel formulation for vaginal delivery of

- clotrimazole: formulation, preparation, and in vitro/in vivo evaluation, *Pharm Dev Technol* 22, 551-561.
194. Soliman, G. M., Fetih, G., and Abbas, A. M. (2017) Thermosensitive bioadhesive gels for the vaginal delivery of sildenafil citrate: in vitro characterization and clinical evaluation in women using clomiphene citrate for induction of ovulation, *Drug Dev Ind Pharm* 43, 399-408.
 195. Astafieva, I., Maksimova, I., Lukanidin, E., Alakhov, V., and Kabanov, A. (1996) Enhancement of the polycation-mediated DNA uptake and cell transfection with Pluronic P85 block copolymer, *FEBS Letters* 389, 278-280.
 196. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf11/P110003c.pdf.
 197. Vandenhaute, M., Schelfhout, J., Van Vlierberghe, S., Mendes, E., and Dubrue, P. (2014) Cross-linkable, thermo-responsive Pluronic® building blocks for biomedical applications: Synthesis and physico-chemical evaluation, *European Polymer Journal* 53, 126-138.
 198. Peng, S., Lin, J.-Y., Cheng, M.-H., Wu, C.-W., and Chu, I. M. (2016) A cell-compatible PEO-PPO-PEO (Pluronic®)-based hydrogel stabilized through secondary structures, *Materials Science and Engineering: C* 69, 421-428.
 199. Cohn, D., Sosnik, A., and Levy, A. (2003) Improved reverse thermo-responsive polymeric systems, *Biomaterials* 24, 3707-3714.
 200. Cohn, D., and Sosnik, A. (2003) Novel reverse thermoresponsive injectable poly(ether carbonate)s, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14, 175-180.
 201. Cohn, D., Sosnik, A., and Kheyfetz, M. (2003) Novel reverse thermo-sensitive block copolymers, Google Patents.
 202. Sosnik, A., Cohn, D., Román, J. S., and Abraham, G. A. (2003) Crosslinkable PEO-PPO-PEO-based reverse thermo-responsive gels as potentially injectable materials, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14, 227-239.
 203. Cohn, D., and Levi, A. (2003) Chain-extended or crosslinked polyethylene oxide/polypropylene oxide/polyethylene oxide block polymer with optional polyester blocks, Google Patents.
 204. Sawhney, A. S., Pathak, C. P., and Hubbell, J. A. (1993) Bioerodible Hydrogels Based on Photopolymerized Poly(Ethylene Glycol)-Co-Poly(Alpha-Hydroxy Acid) Diacrylate Macromers, *Macromolecules* 26, 581-587.
 205. Casey D.J., J. P. K., Rosati L. US patent 4,716,203
 206. Kim, M. R., and Park, T. G. (2002) Temperature-responsive and degradable hyaluronic acid/Pluronic composite hydrogels for controlled release of human growth hormone, *J Control Release* 80, 69-77.
 207. Sosnik, A., Cohn, D., San Roman, J. S., and Abraham, G. A. (2003) Crosslinkable PEO-PPO-PEO-based reverse thermo-responsive gels as potentially injectable materials, *J Biomat Sci-Polym E* 14, 227-239.
 208. Cellesi, F., Tirelli, N., and Hubbell, J. A. (2002) Materials for cell encapsulation via a new tandem approach combining reverse thermal gelation and covalent crosslinking, *Macromol Chem Phys* 203, 1466-1472.
 209. Cellesi, F., Weber, W., Fussenegger, M., Hubbell, J. A., and Tirelli, N. (2004) Towards a fully synthetic substitute of alginate: Optimization of, a thermal gelation/chemical cross-linking scheme ("Tandem" gelation) for the production of beads and liquid-core capsules, *Biotechnol Bioeng* 88, 740-749.
 210. Zhu, W., Wang, B. B., Zhang, Y., and Ding, J. D. (2005) Preparation of a thermosensitive and biodegradable microgel via polymerization of macromonomers based on diacrylated Pluronic/oligoester copolymers, *European Polymer Journal* 41, 2161-2170.
 211. Cohn D., S. A. Multi component polymeric systems with reverse thermal gelation behaviour (PEO - PPO copolymers).
 212. Jin, E., Zhang, Z., Lian, H., Chen, X., Xiao, C., Zhuang, X., and Chen, X. (2017) Injectable electroactive hydrogels based on Pluronic® F127 and tetraaniline copolymer, *European Polymer Journal* 88, 67-74.

213. Song, L., Zhang, B., Gao, G., Xiao, C., and Li, G. (2019) Single component Pluronic F127-lipoic acid hydrogels with self-healing and multi-responsive properties, *European Polymer Journal* 115, 346-355.
214. Bevington, J. C., and Harris, D. O. (1967) Reactivities of acrylates and methacrylates, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* 5, 799-802.
215. Russell, G. T. (2002) *The kinetics of free-radical polymerization: Fundamental aspects*, Vol. 55.
216. Pei, Y., Zhao, L., Du, G., Li, N., Xu, K., and Yang, H. (2016) Investigation of the degradation and stability of acrylamide-based polymers in acid solution: Functional monomer modified polyacrylamide, *Petroleum* 2, 399-407.
217. Cellesi, F., Tirelli, N., and Hubbell, J. A. (2004) Towards a fully-synthetic substitute of alginate: development of a new process using thermal gelation and chemical cross-linking, *Biomaterials* 25, 5115-5124.
218. Lee, J. B., Yoon, J. J., Lee, D. S., and Park, T. G. (2004) Photo-crosslinkable, thermo-sensitive and biodegradable Pluronic hydrogels for sustained release of protein, *J Biomat Sci-Polym E* 15, 1571-1583.
219. Gogotov, A. F. (2017) High-Performance thermal polymerization inhibitors based on 4-tert-Butylcatechol and its compositions for petrochemical plants, *Petroleum Chemistry* 57, 891-896.
220. Rudin, A., and Choi, P. (2013) Chapter 8 - Free-Radical Polymerization, In *The Elements of Polymer Science & Engineering (Third Edition)* (Rudin, A., and Choi, P., Eds.), pp 341-389, Academic Press, Boston.
221. Arrhenius, S. (1917) Über die Dissociationswärme und den Einfluss der Temperatur auf den Dissoziationsgrad der Elektrolyte, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 4.
222. Ji, S., Hoyer, T. R., and Macosko, C. W. (2005) Primary Amine (–NH₂) Quantification in Polymers: Functionality by ¹⁹F NMR Spectroscopy, *Macromolecules* 38, 4679-4686.
223. Du, Y. J., and Brash, J. L. (2003) Synthesis and characterization of thiol-terminated poly(ethylene oxide) for chemisorption to gold surface, *J Appl Polym Sci* 90, 594-607.
224. Alexandridis, P., and Hatton, T. A. (1995) Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Block-Copolymer Surfactants in Aqueous-Solutions and at Interfaces - Thermodynamics, Structure, Dynamics, and Modeling, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 96, 1-46.
225. Zhou, Z. K., and Chu, B. (1988) Light-Scattering Study on the Association Behavior of Triblock Polymers of Ethylene-Oxide and Propylene-Oxide in Aqueous-Solution, *J Colloid Interf Sci* 126, 171-180.
226. Bates, F. S., Rosedale, J. H., Koppi, K. A., Almdal, K., and Mortensen, K. (1992) Phase-Behavior of Polyolefin Block Copolymers, *Abstr Pap Am Chem S* 204, 115-PMSE.
227. Linse, P., and Malmsten, M. (1992) Temperature-Dependent Micellization in Aqueous Block Copolymer Solutions, *Macromolecules* 25, 5434-5439.
228. Malmsten, M., and Lindman, B. (1992) Self-Assembly in Aqueous Block Copolymer Solutions, *Macromolecules* 25, 5440-5445.
229. Zhang, K. W., and Khan, A. (1995) Phase-Behavior of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Water, *Macromolecules* 28, 3807-3812.
230. Nagarajan, R., and Barry, M. (1986) Unusual Selectivity in Solubilization by Block Copolymer Micelles, *Abstr Pap Am Chem S* 191, 287-COLL.
231. Collett, J. H., and Tobin, E. A. (1979) Relationships between Poloxamer Structure and the Solubilization of Some Para-Substituted Acetanilides, *J Pharm Pharmacol* 31, 174-177.
232. Saito, Y., Kondo, Y., Abe, M., and Sato, T. (1994) Solubilization Behavior of Estradiol in an Aqueous-Solution of Pluronic L-64 as a Function of Concentration and Temperature, *Chem Pharm Bull* 42, 1348-1350.

233. Kwon, G. S., and Kataoka, K. (1995) Block-Copolymer Micelles as Long-Circulating Drug Vehicles, *Adv Drug Deliver Rev* 16, 295-309.
234. Ben-Naim, A. (1980) *Hydrophobic interactions*, Plenum, New York.
235. Lang J., Z. R. (1987) *Surfactant solutions - New methods of investigation*, Marcel Dekker, New York.
236. Booth, C., Naylor, T. D., Price, C., Rajab, N. S., and Stubbersfield, R. B. (1978) Investigation of Size Distribution of Nonionic Micelles Formed from a Polystyrene-Polyisoprene Block Copolymer in N,N-Dimethylacetamide, *J Chem Soc Farad T* 1 74, 2352-2362.
237. Tuzar, Z., Petrus, V., and Kratochv.P. (1974) Sedimentation and Light-Scattering Study of Block Copolymer Association, *Makromol Chem* 175, 3181-3192.
238. Desjardins, A., Vandeven, T. G. M., and Eisenberg, A. (1992) Colloidal Properties of Block Ionomers .2. Characterization of Reverse Micelles of Styrene-B-Methacrylic Acid and Styrene-B-Metal Methacrylate Diblocks by Dynamic Light-Scattering, *Macromolecules* 25, 2412-2421.
239. Price, C. (1983) The 18th-Century - Rogers,P, *Rev Engl Stud* 34, 220-221.
240. Tuzar, Z., and Kratochvil, P. (1976) Block and Graft Copolymer Micelles in Solution, *Advances in Colloid and Interface Science* 6, 201-232.
241. Florence, D. A. a. A. T. (1983) *Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology.*, Chapman and Hall, London.
242. Alexandridis, P., Nivaggioli, T., Holzwarth, J. F., and Hatton, T. A. (1994) Characterization of Block-Copolymer Micellar Solutions - Thermodynamics and Microenvironment, *Abstr Pap Am Chem S* 207, 234-POLY.
243. Hiemenz, P. C. (1986) *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York.
244. Almgren, M., Brown, W., and Hvidt, S. (1995) Self-aggregation and phase behavior of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers in aqueous solution, *Colloid Polym Sci* 273, 2-15.
245. Sharma, R., and Bahadur, P. (2002) Effect of different additives on the cloud point of a polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide block copolymer in aqueous solution, *Journal of Surfactants and Detergents* 5, 263-268.
246. Silva, R. C. d., and Loh, W. (1998) Effect of Additives on the Cloud Points of Aqueous Solutions of Ethylene Oxide-Propylene Oxide-Ethylene Oxide Block Copolymers, *J Colloid Interf Sci* 202, 385-390.
247. Huibers, P. D. T., Shah, D. O., and Katritzky, A. R. (1997) Predicting Surfactant Cloud Point from Molecular Structure, *J Colloid Interf Sci* 193, 132-136.
248. Pandya, K., Lad, K., and Bahadur, P. (1993) Effect of Additives on the Clouding Behavior of an Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer in Aqueous Solution, *Journal of Macromolecular Science, Part A* 30, 1-18.
249. Pandya, K., Bahadur, P., Nagar, T. N., and Bahadur, A. (1993) Micellar and Solubilizing Behavior of Pluronic L-64 in Water, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 70, 219-227.
250. Almgren, M., Hansson, P., Mukhtar, E., and Van Stam, J. (1992) Aggregation of alkyltrimethylammonium surfactants in aqueous poly(styrenesulfonate) solutions, *Langmuir* 8, 2405-2412.
251. Gu, T., and Galera-Gómez, P. A. (1999) The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X-100 in water, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 147, 365-370.
252. Jørgensen, E. B., Hvidt, S., Brown, W., and Schillén, K. (1997) Effects of Salts on the Micellization and Gelation of a Triblock Copolymer Studied by Rheology and Light Scattering, *Macromolecules* 30, 2355-2364.
253. Bahadur, P., Pandya, K., Almgren, M., Li, P., and Stilbs, P. (1993) Effect of inorganic salts on the micellar behaviour of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers in aqueous solution, *Colloid Polym Sci* 271, 657-667.
254. Goddard, E. D., Hoeve, C. A. J., and Benson, G. C. (1957) Heats of Micelle Formation of Paraffin Chain Salts in Water, *J Phys Chem-Us* 61, 593-598.

255. Zhou, Z. K., and Chu, B. (1988) Anomalous Micellization Behavior and Composition Heterogeneity of a Triblock ABA Copolymer of (a) Ethylene-Oxide and (B) Propylene-Oxide in Aqueous-Solution, *Macromolecules* 21, 2548-2554.
256. Alexandridis, P., Athanassiou, V., Fukuda, S., and Hatton, T. A. (1994) Surface-Activity of Poly(Ethylene Oxide)-Block-Poly(Propylene Oxide)-Block-Poly(Ethylene Oxide) Copolymers, *Langmuir* 10, 2604-2612.
257. Tsui, H. W., Hsu, Y. H., Wang, J. H., and Chen, L. J. (2008) Novel behavior of heat of micellization of pluronics F68 and F88 in aqueous solutions, *Langmuir* 24, 13858-13862.
258. Tsui, H.-W., Wang, J.-H., Hsu, Y.-H., and Chen, L.-J. (2010) Study of heat of micellization and phase separation for Pluronic aqueous solutions by using a high sensitivity differential scanning calorimetry, *Colloid Polym Sci* 288, 1687-1696.
259. Grieser, F., and Drummond, C. J. (1988) The Physicochemical Properties of Self-Assembled Surfactant Aggregates as Determined by Some Molecular Spectroscopic Probe Techniques, *J Phys Chem-Us* 92, 5580-5593.
260. Turro, N. J., and Chung, C. J. (1984) Photoluminescent Probes for Water-Soluble Polymers - Pressure and Temperature Effects on a Polyol Surfactant, *Macromolecules* 17, 2123-2126.
261. Bruce J. Berne, R. P. (2000) *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*.
262. Pandit, N., Trygstad, T., Croy, S., Bohorquez, M., and Koch, C. (2000) Effect of salts on the micellization, clouding, and solubilization behavior of pluronic F127 solutions, *J Colloid Interf Sci* 222, 213-220.
263. Berne B., P. R. (1976) *Dynamic Light Scattering with applications to Chemistry, Biology and Physics*, Wiley Interscience.
264. Sharma, P. K., and Bhatia, S. R. (2004) Effect of anti-inflammatories on Pluronic F127: micellar assembly, gelation and partitioning, *Int J Pharm* 278, 361-377.
265. Wanka, G., Hoffmann, H., and Ulbricht, W. (1994) Phase-Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(Oxyethylene)-Poly(Oxypropylene)-Poly(Oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous-Solutions, *Macromolecules* 27, 4145-4159.
266. Becher, P. (1993) A review of: "Micelles: Theoretical and Applied Aspects." Yoshikiyo Moroi. Plenum, New York, 1992. pp. ix + 252. 559.50. (ISBN 0-306-43996-4), *Journal of Dispersion Science and Technology* 14, 603-604.
267. Swennen, I. (2008) Vernetbare, thermoresponsieve hydrogelen, als potentiële dragersystemen voor geneesmiddelaafgifte en matrices voor weefselregeneratie., In *Faculteit Wetenschappen*, UGent.
268. Hopkins, C., and Bruyn, J. (2019) Gelation and long-time relaxation of aqueous solutions of Pluronic F127, *J Rheol* 63, 191-201.
269. Mitchell, J. R. (1976) Rheology of Gels, *J Texture Stud* 7, 313-339.
270. Nishinari, K. (1997) Rheological and DSC study of sol-gel transition in aqueous dispersions of industrially important polymers and colloids, *Colloid Polym Sci* 275, 1093-1107.
271. Lenk, R. S. (1978) *Polymer rheology*, Applied Science Publishers, London.
272. Brown, W., Schillen, K., and Hvidt, S. (1992) Triblock Copolymers in Aqueous-Solution Studied by Static and Dynamic Light-Scattering and Oscillatory Shear Measurements - Influence of Relative Block Sizes, *J Phys Chem-Us* 96, 6038-6044.
273. HH Winter, F. C. (1986) Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. , *J Rheol* 30, 367-382.
274. Muller, R., Gerard, E., Dugand, P., Rempp, P., and Gnanou, Y. (1991) Rheological characterization of the gel point: a new interpretation, *Macromolecules* 24, 1321-1326.
275. Terech, P., and Weiss, R. G. (1997) Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids and the Properties of Their Gels, *Chem Rev* 97, 3133-3160.
276. Kalarakis, A., Yang, Z., Pousia, E., Nixon, S. K., Price, C., Booth, C., Hamley, I. W., Castelletto, V., and Fundin, J. (2001) Association properties of diblock

- copolymers of propylene oxide and ethylene oxide in aqueous solution. The effect of P and E block lengths, *Langmuir* 17, 8085-8091.
277. El-Kamel, A. H. (2002) In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate, *Int J Pharm* 241, 47-55.
 278. Jain, N. J., Aswal, V. K., Goyal, P. S., and Bahadur, P. (2000) Salt induced micellization and micelle structures of PEO/PPO/PEO block copolymers in aqueous solution, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 173, 85-94.
 279. Alexandridis, P. (1997) Poly(ethylene oxide) poly(propylene oxide) block copolymer surfactants, *Curr Opin Colloid In* 2, 478-489.
 280. Jain, N. J., Aswal, V. K., Goyal, P. S., and Bahadur, P. (1998) Micellar Structure of an Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer: A Small-Angle Neutron Scattering Study, *The Journal of Physical Chemistry B* 102, 8452-8458.
 281. Ricci, E. J., Bentley, M. V. L. B., Farah, M., Bretas, R. E. S., and Marchetti, J. M. (2002) Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels, *Eur J Pharm Sci* 17, 161-167.
 282. Pandit, N. K., and Wang, D. (1998) Salt effects on the diffusion and release rate of propranolol from poloxamer 407 gels, *Int J Pharm* 167, 183-189.
 283. Schott, H. (1997) Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants .15. Effect of transition metal salts on the cloud point of octoxynol 9 (Triton X-100), *J Colloid Interf Sci* 192, 458-462.
 284. Bharatiya, B., Ghosh, G., Aswal, V. K., and Bahadur, P. (2010) Effect of n-Hexanol and n-Hexylamine on the Micellar Solutions of Pluronic F127 and P123 in Water and 1M NaCl, *Journal of Dispersion Science and Technology* 31, 660-667.
 285. Kadam, Y., Yerramilli, U., and Bahadur, A. (2009) Solubilization of poorly water-soluble drug carbamazepine in pluronic micelles: effect of molecular characteristics, temperature and added salt on the solubilizing capacity, *Colloids Surf B Biointerfaces* 72, 141-147.
 286. Ganguly, R., Choudhury, N., Aswal, V. K., and Hassan, P. A. (2009) Pluronic L64 Micelles near Cloud Point: Investigating the Role of Micellar Growth and Interaction in Critical Concentration Fluctuation and Percolation, *The Journal of Physical Chemistry B* 113, 668-675.
 287. Yong, C. S., Choi, J. S., Quan, Q. Z., Rhee, J. D., Kim, C. K., Lim, S. J., Kim, K. M., Oh, P. S., and Choi, H. G. (2001) Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium, *Int J Pharm* 226, 195-205.
 288. Davidson, R. S. (1993) THE CHEMISTRY OF PHOTOINITIATORS - SOME RECENT DEVELOPMENTS, *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* 73, 81-96.
 289. Monroe, B. M., and Weed, G. C. (1993) Photoinitiators for Free-Radical-Initiated Photoimaging Systems, *Chem Rev* 93, 435-448.
 290. Chen, M., Zhong, M., and Johnson, J. A. (2016) Light-Controlled Radical Polymerization: Mechanisms, Methods, and Applications, *Chem Rev* 116, 10167-10211.
 291. Bryant, S. J., Nuttelman, C. R., and Anseth, K. S. (2000) Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro, *J Biomat Sci-Polym E* 11, 439-457.
 292. Wu, J., Zhao, X., Wu, D., and Chu, C.-C. (2014) Development of a biocompatible and biodegradable hybrid hydrogel platform for sustained release of ionic drugs, *Journal of Materials Chemistry B* 2, 6660-6668.
 293. Sabnis, A., Rahimi, M., Chapman, C., and Nguyen, K. T. (2009) Cytocompatibility studies of an in situ photopolymerized thermoresponsive hydrogel nanoparticle system using human aortic smooth muscle cells, *Journal of biomedical materials research. Part A* 91, 52-59.
 294. Schmocker, A., Khoushabi, A., Schizas, C., Bourban, P. E., Pioletti, D. P., and Moser, C. (2014) Photopolymerizable hydrogels for implants: Monte-Carlo modeling and experimental in vitro validation, *J Biomed Opt* 19, 35004.

295. Olayan, H. B., Hamid, H. S., and Owen, E. D. (1996) Photochemical and thermal crosslinking of polymers, *Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics C36*, 671-719.
296. Shukla, V., Bajpai, M., Singh, D. K., Singh, M., and Shukla, R. (2004) *Review of basic chemistry of UV-curing technology*, Vol. 33.
297. Krishna Rao, K. S. V., and Kummara, M. R. (2012) A Review on Radical Polymerization Used for Design and Development of Biomaterials" by NOVA Publications, pp 175-198.
298. Shi, J., Xing, M. M. Q., and Zhong, W. (2012) Development of Hydrogels and Biomimetic Regulators as Tissue Engineering Scaffolds, *Membranes* 2, 70-90.
299. Fairbanks, B. D., Schwartz, M. P., Bowman, C. N., and Anseth, K. S. (2009) Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility, *Biomaterials* 30, 6702-6707.
300. Budtova, T., and Suleimenov, I. (1997) Swelling behaviour of a polyelectrolyte network under load, *Polymer* 38, 5947-5952.
301. Netti, P. A., Shelton, J. C., Revell, P. A., Pirie, G., Smith, S., Ambrosio, L., Nicolais, L., and Bonfield, W. (1993) Hydrogels as an interface between bone and an implant, *Biomaterials* 14, 1098-1104.
302. Hong, K.-H., Jeon, Y.-S., and Kim, J.-H. (2009) Preparation and properties of modified PHEMA hydrogels containing thermo-responsive pluronic component, *Macromolecular Research* 17, 26-30.
303. Altinok, H., Yu, G. E., Nixon, S. K., Gorrry, P. A., Attwood, D., and Booth, C. (1997) Effect of block architecture on the self-assembly of copolymers of ethylene oxide and propylene oxide in aqueous solution, *Langmuir* 13, 5837-5848.
304. Mawad, D., Odell, R., and Poole-Warren, L. A. (2009) Network structure and macromolecular drug release from poly(vinyl alcohol) hydrogels fabricated via two crosslinking strategies, *Int J Pharm* 366, 31-37.
305. Kang, G. D., Cheon, S. H., Khang, G., and Song, S.-C. (2006) Thermosensitive poly(organophosphazene) hydrogels for a controlled drug delivery, *Eur J Pharm Biopharm* 63, 340-346.
306. Kim, I. S., Jeong, Y. I., Kim, D. H., Lee, K. H., and Kim, S. H. (2001) Albumin release from biodegradable hydrogels composed of dextran and poly(ethylene glycol) macromer, *Arch Pharm Res* 24, 69-73.
307. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
308. Eshel-Green, T., and Bianco-Peled, H. (2016) Mucoadhesive acrylated block copolymers micelles for the delivery of hydrophobic drugs, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 139, 42-51.
309. Wakaskar, R. R., Bathena Sp Fau - Tallapaka, S. B., Tallapaka Sb Fau - Ambardekar, V. V., Ambardekar Vv Fau - Gautam, N., Gautam N Fau - Thakare, R., Thakare R Fau - Simet, S. M., Simet Sm Fau - Curran, S. M., Curran Sm Fau - Singh, R. K., Singh Rk Fau - Dong, Y., Dong Y Fau - Vetro, J. A., and Vetro, J. A. (2014) Peripherally cross-linking the shell of core-shell polymer micelles decreases premature release of physically loaded combretastatin A4 in whole blood and increases its mean residence time and subsequent potency against primary murine breast tumors after IV administration, *Pharm Res* 32(3).
310. Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., and Alakhov, V. Y. (2002) Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *J Control Release* 82, 189-212.
311. Bryant, S. J., Nuttelman, C. R., and Anseth, K. S. (2000) Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro, *J Biomater Sci Polym Ed* 11, 439-457.
312. Quick, D. J., and Anseth, K. S. (2003) Gene delivery in tissue engineering: a photopolymer platform to coencapsulate cells and plasmid DNA, *Pharm Res* 20, 1730-1737.

313. Gurav, D. D., Kulkarni, A. S., Khan, A., and Shinde, V. S. (2016) pH-responsive targeted and controlled doxorubicin delivery using hyaluronic acid nanocarriers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 143, 352-358.
314. Eisele, G., Fouassier, J. P., and Reeb, R. (1997) Kinetics of photocrosslinking reactions of a DCPA/EA matrix in the presence of thiols and acrylates, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 35, 2333-2345.
315. Shin, J., Matsushima, H., Chan, J. W., and Hoyle, C. E. (2009) Segmented Polythiourethane Elastomers through Sequential Thiol-Ene and Thiol-Isocyanate Reactions, *Macromolecules* 42, 3294-3301.
316. Hoyle, C. E., Lee, T. Y., and Roper, T. (2004) Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 42, 5301-5338.
317. Li, Q., Zhou, H., Wicks, D. A., and Hoyle, C. E. (2007) Thiourethane-based thiol-ene high T-g networks: Preparation, thermal, mechanical, and physical properties, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 45, 5103-5111.
318. Wei, H. Y., Senyurt, A. F., Jonsson, S., and Hoyle, C. E. (2007) Photopolymerization of ternary thiol-ene/acrylate systems: Film and network properties, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 45, 822-829.
319. Senyurt, A. F., Wei, H., Phillips, B., Cole, M., Nazarenko, S., Hoyle, C. E., Piland, S. G., and Gould, T. E. (2006) Physical and mechanical properties of photopolymerized thiol-ene/acrylates, *Macromolecules* 39, 6315-6317.
320. Senyurt, A. F., Wei, H. Y., Hoyle, C. E., Piland, S. G., and Gould, T. E. (2007) Ternary thiol-ene/acrylate photopolymers: Effect of acrylate structure on mechanical properties, *Macromolecules* 40, 4901-4909.
321. Shin, J., Nazarenko, S., and Hoyle, C. E. (2008) Enthalpy relaxation of photopolymerized thiol-ene networks: Structural effects, *Macromolecules* 41, 6741-6746.
322. Yang, Z. L., Wicks, D. A., Hoyle, C. E., Pu, H. T., Yuan, J. J., Wan, D. C., and Liu, Y. S. (2009) Newly UV-curable polyurethane coatings prepared by multifunctional thiol- and ene-terminated polyurethane aqueous dispersions mixtures: Preparation and characterization, *Polymer* 50, 1717-1722.
323. Zhou, H., Li, Q., Shin, J., and Hoyle, C. E. (2009) Effects of Monomer Functionality and Hydrogen Bonding on the Polymerization Kinetics and Properties of Thiol-Ene Networks, *Macromolecules* 42, 2994-2999.
324. Clark, T., Kwisnek, L., Hoyle, C. E., and Nazarenko, S. (2009) Photopolymerization of Thiol-Ene Systems Based on Oligomeric Thiols, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 47, 14-24.
325. Li, Q., Zhou, H., and Hoyle, C. E. (2009) The effect of thiol and ene structures on thiol-ene networks: Photopolymerization, physical, mechanical and optical properties, *Polymer* 50, 2237-2245.
326. Carioscia, J. A., Stansbury, J. W., and Bowman, C. N. (2007) Evaluation and control of thiol-ene/thiol-epoxy hybrid networks, *Polymer* 48, 1526-1532.
327. Cramer, N. B., Reddy, S. K., O'Brien, A. K., and Bowman, C. N. (2003) Thiol-ene photopolymerization mechanism and rate limiting step changes for various vinyl functional group chemistries, *Macromolecules* 36, 7964-7969.
328. Khire, V. S., Benoit, D. S. W., Anseth, K. S., and Bowman, C. N. (2006) Ultrathin gradient films using thiol-ene polymerizations, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 44, 7027-7039.
329. Khire, V. S., Harant, A. W., Watkins, A. W., Anseth, K. S., and Bowman, C. N. (2006) Ultrathin patterned polymer films on surfaces using thiol-ene polymerizations, *Macromolecules* 39, 5081-5086.
330. Lee, T. Y., Smith, Z., Reddy, S. K., Cramer, N. B., and Bowman, C. N. (2007) Thiol-allyl ether-methacrylate ternary systems. Polymerization mechanism, *Macromolecules* 40, 1466-1472.
331. Rydholm, A. E., Reddy, S. K., Anseth, K. S., and Bowman, C. N. (2007) Development and characterization of degradable thiol-allyl ether photopolymers, *Polymer* 48, 4589-4600.

332. Rydholm, A. E., Held, N. L., Bowman, C. N., and Anseth, K. S. (2006) Gel permeation chromatography characterization of the chain length distributions in thiol-acrylate photopolymer networks, *Macromolecules* 39, 7882-7888.
333. Posner, T. (1905) Zur Kenntniss der β -Aminosäuren, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 38, 2316-2325.
334. Kharasch, M. S. R., A. T.; Mayo, . (1938) *F. R. Chem. and Ind.* 57, 752.
335. Morgan, C. R., Magnotta, F., and Ketley, A. D. (1977) Thiol/ene photocurable polymers, *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* 15, 627-645.
336. Jacobine, A. F., Glaser, D. M., Grabek, P. J., Mancini, D., Masterson, M., Nakos, S. T., Rakas, M. A., and Woods, J. G. (1992) PHOTOCROSSLINKED NORBORNENE THIOL COPOLYMERS - SYNTHESIS, MECHANICAL-PROPERTIES, AND CURE STUDIES, *J Appl Polym Sci* 45, 471-485.
337. Szmant, H. H., Mata, A. J., Namis, A. J., and Panthananickal, A. M. (1976) THIOL-OLEFIN CO-OXIDATION (TOCO) REACTION .4. TEMPERATURE EFFECTS ON PRODUCT DISTRIBUTION IN TOCO REACTION OF INDENE AND AROMATIC THIOLS, *Tetrahedron* 32, 2665-2680.
338. Klemm, E., Holfter, U., Sensfuss, S., and Flammersheim, H. J. (1987) INVESTIGATIONS ON THE MECHANISM OF THIOL-EN-PHOTOADDITION POLYMERIZATION, *Angew. Makromol. Chem.* 150, 161-169.
339. Klemm, E., Sensfuss, S., Holfter, U., and Flammersheim, H. J. (1993) FREE-RADICAL STABILIZERS FOR THE THIOL/ENE-SYSTEMS, *Angew. Makromol. Chem.* 212, 121-127.
340. Dsouza, V. T., Nanjundiah, R., Baeza, J., and Szmant, H. H. (1987) THIOL-OLEFIN COOXIDATION (TOCO) REACTION .7. A H-1-NMR STUDY OF THIOL SOLVATION, *J. Org. Chem.* 52, 1720-1725.
341. Dsouza, V. T., Iyer, V. K., and Szmant, H. H. (1987) THIOL-OLEFIN COOXIDATION (TOCO) REACTION .8. SOLVENT EFFECTS IN THE OXIDATION OF SOME THIOLS WITH MOLECULAR-OXYGEN, *J. Org. Chem.* 52, 1725-1728.
342. Kuhne, G., Diesen, J. S., and Klemm, E. (1996) New results of the self-initiation mechanism of SH/En addition polymerization, *Angew. Makromol. Chem.* 242, 139-145.
343. Lowe, A. B. (2010) Thiol-ene "click" reactions and recent applications in polymer and materials synthesis, *Polymer Chemistry* 1, 17-36.
344. Napoli, A., Tirelli, N., Kilcher, G., and Hubbell, A. (2001) New Synthetic Methodologies for Amphiphilic Multiblock Copolymers of Ethylene Glycol and Propylene Sulfide, *Macromolecules* 34, 8913-8917.
345. Lutolf, M. P., and Hubbell, J. A. (2003) Synthesis and Physicochemical Characterization of End-Linked Poly(ethylene glycol)-co-peptide Hydrogels Formed by Michael-Type Addition, *Biomacromolecules* 4, 713-722.
346. Lutolf, M. P., Tirelli, N., Cerritelli, S., Cavalli, L., and Hubbell, J. A. (2001) Systematic Modulation of Michael-Type Reactivity of Thiols through the Use of Charged Amino Acids, *Bioconjugate Chem* 12, 1051-1056.
347. Elbert, D. L., Pratt, A. B., Lutolf, M. P., Halstenberg, S., and Hubbell, J. A. (2001) Protein delivery from materials formed by self-selective conjugate addition reactions, *J Control Release* 76, 11-25.
348. Riener, C. K., Kada, G., and Gruber, H. J. (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine, *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 266-276.
349. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.
350. Gruhlke, M. C., and Slusarenko, A. J. (2012) The biology of reactive sulfur species (RSS), *Plant Physiol Biochem* 59, 98-107.
351. Li, J., and Yuan, J. (2008) Caspases in apoptosis and beyond, *Oncogene* 27, 6194-6206.
352. Tolbert, B. S., Tajc, S. G., Webb, H., Snyder, J., Nielsen, J. E., Miller, B. L., and Basavappa, R. (2005) The active site cysteine of ubiquitin-conjugating enzymes has a significantly elevated pKa: functional implications, *Biochemistry-Us* 44, 16385-16391.

353. Stenzel, M. (2012) Bioconjugation Using Thiols: Old Chemistry Rediscovered to Connect Polymers with Nature's Building Blocks, *ACS Macro Letters* 2, 14–18.
354. Zhang, X., Achazi, K., Steinhilber, D., Kratz, F., Dervede, J., and Haag, R. (2014) A facile approach for dual-responsive prodrug nanogels based on dendritic polyglycerols with minimal leaching, *J Control Release* 174, 209-216.
355. E Rydholm, A., N Bowman, C., and Anseth, K. (2005) *Degradable thiol-acrylate photopolymers: Polymerization and degradation behavior of an in situ forming biomaterial*, Vol. 26.
356. Cramer, N. B., Scott, J. P., and Bowman, C. N. (2002) Photopolymerizations of Thiol–Ene Polymers without Photoinitiators, *Macromolecules* 35, 5361-5365.
357. Metters, A. T., Anseth, K. S., and Bowman, C. N. (2000) Fundamental studies of a novel, biodegradable PEG-b-PLA hydrogel, *Polymer* 41, 3993-4004.
358. Asano, M., Yoshida, M., Kaetsu, I., Katakai, R., Mashimo, T., Yuasa, H., Imai, K., and Yamanaka, H. (1988) Enzymatic Degradation of Sequential Polymers Containing a Tripeptide Sequence L-Alanine–L-Leucine– γ -Ethyl L-Glutamate and an α -Hydroxy Acid L-Lactic Acid or α -Amino Acid L-Alanine, *Polym J* 20, 281-284.
359. Yoshida, M., Asano, M., Kumakura, M., Katakai, R., Mashimo, T., Yuasa, H., and Yamanaka, H. (1991) Sequential polydepsipeptides containing tripeptide sequences and α -hydroxy acids as biodegradable carriers, *European Polymer Journal* 27, 325-329.
360. Ouchi, T., Nozaki, T., Ishikawa, A., Fujimoto, I., and Ohya, Y. (1997) Synthesis and enzymatic hydrolysis of lactic acid–depsipeptide copolymers with functionalized pendant groups, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 35, 377-383.
361. Holback, H., Yeo, Y., and Park, K. (2011) 1 - Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications A2 - Rimmer, Steve, In *Biomedical Hydrogels*, pp 3-24, Woodhead Publishing.
362. West, J. L., and Hubbell, J. A. (1999) Polymeric biomaterials with degradation sites for proteases involved in cell migration, *Macromolecules* 32, 241-244.
363. Lutolf, M. P., Raeber, G. P., Zisch, A. H., Tirelli, N., and Hubbell, J. A. (2003) Cell - Responsive Synthetic Hydrogels, *Advanced Materials* 15, 888-892.
364. van Dijk-Wolthuis, W. N. E., Franssen, O., Talsma, H., van Steenberg, M. J., Kettenes-van den Bosch, J. J., and Hennink, W. E. (1995) Synthesis, Characterization, and Polymerization of Glycidyl Methacrylate Derivatized Dextran, *Macromolecules* 28, 6317-6322.
365. Nishinari, K., Kohyama, K., Kumagai, H., Funami, T., and Bourne, M. C. (2013) Parameters of Texture Profile Analysis, *Food Science and Technology Research* 19, 519-521.
366. Vlierberghe, S. V. (2008) Cell-Interactive Biopolymer-based Hydrogels designed for Tissue Engineering, In *Department of Organic chemistry*, Ghent University, Ghent.
367. Friedman, H. H., Whitney, J. E., and Szczesniak, A. S. (1963) The Texturometer—A New Instrument for Objective Texture Measurement, *Journal of Food Science* 28, 390-396.
368. Mooney, M. J. (1940) *A Theory of Large Deformation*, Vol. 11.
369. Silberberg, M. (1965) "Dynamic mechanical properties of polymers·· a review", *Polymer Engineering & Science* 5, 171-178.
370. Kasemo, B. (2002) Biological surface science, *Surf Sci* 500, 656-677.
371. Lee, J. H., Kopecek, J., and Andrade, J. D. (1989) PROTEIN-RESISTANT SURFACES PREPARED BY PEO-CONTAINING BLOCK COPOLYMER SURFACTANTS, *J Biomed Mater Res* 23, 351-368.
372. Lee, J. H., Kopeckova, P., Kopecek, J., and Andrade, J. D. (1990) SURFACE-PROPERTIES OF COPOLYMERS OF ALKYL METHACRYLATES WITH METHOXY (POLYETHYLENE OXIDE) METHACRYLATES AND THEIR APPLICATION AS PROTEIN-RESISTANT COATINGS, *Biomaterials* 11, 455-464.

373. Roach, P., Eglin, D., Rohde, K., and Perry, C. C. (2007) Modern biomaterials: a review - bulk properties and implications of surface modifications, *J Mater Sci Mater Med* 18, 1263-1277.
374. Ikada, Y. (1994) SURFACE MODIFICATION OF POLYMERS FOR MEDICAL APPLICATIONS, *Biomaterials* 15, 725-736.
375. Elbert, D. L., and Hubbell, J. A. (1996) Surface treatments of polymers for biocompatibility, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 26, 365-394.
376. Vogler, E. A. (1998) Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces, *Advances in Colloid and Interface Science* 74, 69-117.
377. Shortle, D. (1993) Denatured states of proteins and their roles in folding and stability, *Current Opinion in Structural Biology* 3, 66-74.
378. Hoffman, A. S. (1992) Immobilization of biomolecules and cells on and within polymeric biomaterials, *Clinical Materials* 11, 61-65.
379. Jindřich, K., and Jiyuan, Y. (2007) Hydrogels as smart biomaterials, *Polymer International* 56, 1078-1098.
380. Thevenot, P., Hu, W., and Tang, L. (2008) SURFACE CHEMISTRY INFLUENCE IMPLANT BIOCOMPATIBILITY, *Current topics in medicinal chemistry* 8, 270-280.
381. Xu, L.-C., and Siedlecki, C. A. (2007) Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces, *Biomaterials* 28, 3273-3283.
382. Vladkova, T. G. (2010) Surface Engineered Polymeric Biomaterials with Improved Biocontact Properties, *International Journal of Polymer Science* 2010.
383. Minati, L., Migliaresi, C., Lunelli, L., Viero, G., Dalla Serra, M., and Speranza, G. (2017) Plasma assisted surface treatments of biomaterials, *Biophys Chem* 229, 151-164.
384. Riccardi, C., Barni, R., Selli, E., Mazzone, G., Massafra, M. R., Marcandalli, B., and Poletti, G. (2003) Surface modification of poly(ethylene terephthalate) fibers induced by radio frequency air plasma treatment, *Applied Surface Science* 211, 386-397.
385. Poll, H. U., Schladitz, U., and Schreiter, S. (2001) Penetration of plasma effects into textile structures, *Surface and Coatings Technology* 142-144, 489-493.
386. J. Yip, J., K. Chan, K.M. Sin, K.S. Lau (2002) Low temperature plasma-treated nylon fabrics., *Journal of Materials Processing Technology* 123.
387. Pietsch, G. J. (2001) Peculiarities of Dielectric Barrier Discharges., *Contributions to Plasma Physics* 41.
388. Wagner, H. E., Brandenburg, R., Kozlov, K. V., Sonnenfeld, A., Michel, P., and Behnke, J. F. (2003) The barrier discharge: basic properties and applications to surface treatment, *Vacuum* 71, 417-436.
389. U. Kogelschatz, B. E., W. Egli. (1997) Dielectric-Barrier Discharges. Principle and Applications.
, *J. PHYS IV FRANCE* 7.
390. Kogelschatz, U. (2003) Dielectric-barrier discharges: Their history, discharge physics, and industrial applications, *Plasma Chem. Plasma Process.* 23, 1-46.
391. Massines, F., Gherardi, N., Fornelli, A., and Martin, S. (2005) Atmospheric pressure plasma deposition of thin films by Townsend dielectric barrier discharge, *Surface & Coatings Technology* 200, 1855-1861.
392. Steffens, G. C. M., Nothdurft, L., Buse, G., Thissen, H., Hocker, H., and Klee, D. (2002) High density binding of proteins and peptides to poly(D,L-lactide) grafted with polyacrylic acid, *Biomaterials* 23, 3523-3531.
393. Abbasi, F., Mirzadeh, H., and Katbab, A. A. (2002) Bulk and surface modification of silicone rubber for biomedical applications, *Polymer International* 51, 882-888.
394. Shim, J. K., Na, H. S., Lee, Y. M., Huh, H., and Nho, Y. C. (2001) Surface modification of polypropylene membranes by gamma-ray induced graft copolymerization and their solute permeation characteristics, *J Membrane Sci* 190, 215-226.
395. Poncinépaillard, F., Chevet, B., and Brosse, J. C. (1994) MODIFICATION OF ISOTACTIC POLYPROPYLENE BY A COLD-PLASMA OR AN ELECTRON-BEAM AND

- GRAFTING OF THE ACRYLIC-ACID ONTO THESE ACTIVATED POLYMERS, *J Appl Polym Sci* 53, 1291-1306.
396. Leonard, D. N., Chandler, G. W., and Seraphin, S. (2002) Scanning Electron Microscopy, In *Characterization of Materials*, John Wiley & Sons, Inc.
 397. Siedlecki, C. A., and Marchant, R. E. (1998) Atomic force microscopy for characterization of the biomaterial interface, *Biomaterials* 19, 441-454.
 398. Servoli, E., Maniglio, D., Motta, A., Predazzer, R., and Migliaresi, C. (2005) Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts, *Macromolecular Bioscience* 5, 1175-1183.
 399. Agnihotri, A., Garrett, J. T., Runt, J., and Siedlecki, C. A. (2006) Atomic force microscopy visualization of poly(urethane urea) microphase rearrangements under aqueous environment, *J Biomat Sci-Polym E* 17, 227-238.
 400. Su, T. J., Lu, J. R., Cui, Z. F., Bellhouse, B. J., Thomas, R. K., and Heenan, R. K. (1999) Identification of the location of protein fouling on ceramic membranes under dynamic filtration conditions, *J Membrane Sci* 163, 265-275.
 401. Theeten, J. B., and Aspnes, D. E. (1981) Ellipsometry in Thin Film Analysis, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 11, 97-122.
 402. <https://lot-qd.be>.
 403. Zhu, J. (2010) Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering, *Biomaterials* 31, 4639-4656.
 404. Nuzzo, R. G., Fusco, F. A., and Allara, D. L. (1987) Spontaneously organized molecular assemblies. 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces, *J Am Chem Soc* 109, 2358-2368.
 405. Decher, G. (1997) Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites, *Science* 277, 1232-1237.
 406. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., and Whitesides, G. M. (2005) Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chem Rev* 105, 1103-1170.
 407. Huang, K., Chen, J. S., and Liu, Y. (2013) Bioinspired Synthesis of Cross-Linking of Dopamine-Containing Block Copolymers to Form Thermosensitive Covalent Hydrogels, *Key Engineering Materials* 531-532, 238-241.
 408. Wang, K., Huang, X., Liu, X., Chen, M., Li, X., Ji, L., and Hua, Z. (2016) Bifunctionalized Pluronic F-127-dopamine for antiadhesive coating, *Materials Letters* 185, 569-572.
 409. Love, T. M. (2014) Oxytocin, motivation and the role of dopamine, *Pharmacol Biochem Be* 119, 49-60.
 410. Yu, M. E., Hwang, J. Y., and Deming, T. J. (1999) Role of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in mussel adhesive proteins, *J Am Chem Soc* 121, 5825-5826.
 411. Sever, M. J., Weisser, J. T., Monahan, J., Srinivasan, S., and Wilker, J. J. (2004) Metal-mediated cross-linking in the generation of a marine-mussel adhesive, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 43, 448-450.
 412. Sun, C. J., and Waite, J. H. (2005) Mapping chemical gradients within and along a fibrous structural tissue, mussel byssal threads, *J Biol Chem* 280, 39332-39336.
 413. Huang, K., Lee, B. P., Ingram, D. R., and Messersmith, P. B. (2002) Synthesis and characterization of self-assembling block copolymers containing bioadhesive end groups, *Biomacromolecules* 3, 397-406.
 414. Lee, B. P., Chao, C. Y., Nunalee, F. N., Motan, E., Shull, K. R., and Messersmith, P. B. (2006) Rapid gel formation and adhesion in photocurable and biodegradable block copolymers with high DOPA content, *Macromolecules* 39, 1740-1748.
 415. Vreeland, V., Waite, J. H., and Epstein, L. (1998) MINIREVIEW—POLYPHENOLS AND OXIDASES IN SUBSTRATUM ADHESION BY MARINE ALGAE AND MUSSELS, *Journal of Phycology* 34, 1-8.
 416. Wiegemann, M. (2005) Adhesion in blue mussels (*Mytilus edulis*) and barnacles (genus *Balanus*): Mechanisms and technical applications, *Aquatic Sciences* 67, 166-176.

417. Lee, H., Dellatore, S. M., Miller, W. M., and Messersmith, P. B. (2007) Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings, *Science* 318, 426-430.
418. Lee, H., Lee, B. P., and Messersmith, P. B. (2007) A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos, *Nature* 448, 338-U334.
419. Jiang, J., Zhu, L., Zhu, L., Zhu, B., and Xu, Y. (2011) Surface Characteristics of a Self-Polymerized Dopamine Coating Deposited on Hydrophobic Polymer Films, *Langmuir* 27, 14180-14187.
420. Bernsmann, F., Richert, L., Senger, B., Lavalle, P., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Ball, V. (2008) Use of dopamine polymerisation to produce free-standing membranes from (PLL-HA)_n exponentially growing multilayer films, *Soft Matter* 4, 1621-1624.
421. Ball, V., Frari, D. D., Toniazzo, V., and Ruch, D. (2012) Kinetics of polydopamine film deposition as a function of pH and dopamine concentration: Insights in the polydopamine deposition mechanism, *J Colloid Interf Sci* 386, 366-372.
422. Ding, Y., Weng, L.-T., Yang, M., Yang, Z., Lu, X., Huang, N., and Leng, Y. (2014) Insights into the Aggregation/Deposition and Structure of a Polydopamine Film, *Langmuir* 30, 12258-12269.
423. Kim, H. W., McCloskey, B. D., Choi, T. H., Lee, C., Kim, M.-J., Freeman, B. D., and Park, H. B. (2013) Oxygen Concentration Control of Dopamine-Induced High Uniformity Surface Coating Chemistry, *ACS Applied Materials & Interfaces* 5, 233-238.
424. Bernsmann, F., Ball, V., Addiego, F., Ponche, A., Michel, M., Gracio, J. J. d. A., Toniazzo, V., and Ruch, D. (2011) Dopamine–Melanin Film Deposition Depends on the Used Oxidant and Buffer Solution, *Langmuir* 27, 2819-2825.
425. Ball, V., Gracio, J., Vila, M., Singh, M. K., Metz-Boutigue, M.-H., Michel, M., Bour, J., Toniazzo, V., Ruch, D., and Buehler, M. J. (2013) Comparison of Synthetic Dopamine–Eumelanin Formed in the Presence of Oxygen and Cu²⁺ Cations as Oxidants, *Langmuir* 29, 12754-12761.
426. Wei, Q., Zhang, F., Li, J., Li, B., and Zhao, C. (2010) Oxidant-induced dopamine polymerization for multifunctional coatings, *Polymer Chemistry* 1, 1430-1433.
427. Dang, Y., Xing, C.-M., Quan, M., Wang, Y.-B., Zhang, S.-P., Shi, S.-Q., and Gong, Y.-K. (2015) Substrate independent coating formation and anti-biofouling performance improvement of mussel inspired polydopamine, *Journal of Materials Chemistry B* 3, 4181-4190.
428. Ku, S. H., and Park, C. B. (2010) Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering, *Biomaterials* 31, 9431-9437.
429. Tsai, W.-B., Chen, W.-T., Chien, H.-W., Kuo, W.-H., and Wang, M.-J. (2011) Poly(dopamine) coating of scaffolds for articular cartilage tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 7, 4187-4194.
430. Asanuma, M., Miyazaki, I., and Ogawa, N. (2003) Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease, *Neurotoxicity Research* 5, 165-176.
431. d'Ischia, M., Napolitano, A., Pezzella, A., Meredith, P., and Sarna, T. (2009) Chemical and structural diversity in eumelanins: unexplored bio-optoelectronic materials, *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 3914-3921.
432. Meredith, P., and Sarna, T. (2006) The physical and chemical properties of eumelanin, *Pigment Cell Res* 19, 572-594.
433. Zajac, G. W., Gallas, J. M., Cheng, J., Eisner, M., Moss, S. C., and Alvarado-Swaigood, A. E. (1994) The fundamental unit of synthetic melanin: a verification by tunneling microscopy of X-ray scattering results, *Biochim Biophys Acta* 1199, 271-278.
434. Kaxiras, E., Tsolakidis, A., Zonios, G., and Meng, S. (2006) Structural model of eumelanin, *Phys Rev Lett* 97, 218102.
435. Thathachari, Y. T., and Blois, M. S. (1969) Physical studies on melanins. II. X-ray diffraction, *Biophys J* 9, 77-89.

436. Clancy, C. M., and Simon, J. D. (2001) Ultrastructural organization of eumelanin from *Sepia officinalis* measured by atomic force microscopy, *Biochemistry-Us* 40, 13353-13360.
437. Pezzella, A., Napolitano, A., d'Ischia, M., Prota, G., Seraglia, R., and Traldi, P. (1997) Identification of Partially Degraded Oligomers of 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic Acid in *Sepia* Melanin by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Rapid Commun Mass Sp* 11, 368-372.
438. Kang, S. M., Rho, J., Choi, I. S., Messersmith, P. B., and Lee, H. (2009) Norepinephrine: Material-Independent, Multifunctional Surface Modification Reagent, *J Am Chem Soc* 131, 13224-13225.
439. Bernsmann, F., Ponche, A., Ringwald, C., Hemmerlé, J., Raya, J., Bechinger, B., Voegel, J.-C., Schaaf, P., and Ball, V. (2009) Characterization of Dopamine-Melanin Growth on Silicon Oxide, *The Journal of Physical Chemistry C* 113, 8234-8242.
440. Muller, M., and Kessler, B. (2011) Deposition from dopamine solutions at Ge substrates: an in situ ATR-FTIR study, *Langmuir* 27, 12499-12505.
441. Herlinger, E., Jameson, R. F., and Linert, W. (1995) Spontaneous autoxidation of dopamine, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 259-263.
442. d'Ischia, M., Napolitano, A., Pezzella, A., Land, E., Ramsden, C., and Riley, P. (2005) 5,6-Dihydroxyindoles and Indole5,6-diones, *Advances in Heterocyclic Chemistry - ADVAN HETEROCYCL CHEM* 89, 1-63.
443. Pezzella, A., Iadonisi, A., Valerio, S., Panzella, L., Napolitano, A., Adinolfi, M., and d'Ischia, M. (2009) Disentangling eumelanin "black chromophore": visible absorption changes as signatures of oxidation state- and aggregation-dependent dynamic interactions in a model water-soluble 5,6-dihydroxyindole polymer, *J Am Chem Soc* 131, 15270-15275.
444. Pezzella, A., Panzella, L., Natangelo, A., Arzillo, M., Napolitano, A., and d'Ischia, M. (2007) 5,6-dihydroxyindole tetramers with "anomalous" interunit bonding patterns by oxidative coupling of 5,5',6,6'-tetrahydroxy-2,7'-biindolyl: emerging complexities on the way toward an improved model of eumelanin buildup, *J Org Chem* 72, 9225-9230.
445. Pezzella, A., Panzella, L., Crescenzi, O., Napolitano, A., Navaratman, S., Edge, R., Land, E. J., Barone, V., and d'Ischia, M. (2006) Short-Lived Quinonoid Species from 5,6-Dihydroxyindole Dimers en Route to Eumelanin Polymers: Integrated Chemical, Pulse Radiolytic, and Quantum Mechanical Investigation, *J Am Chem Soc* 128, 15490-15498.
446. Riesz, J. J., Gilmore, J. B., McKenzie, R. H., Powell, B. J., Pederson, M. R., and Meredith, P. (2007) Transition dipole strength of eumelanin, *Physical Review E* 76, 021915.
447. Yu, F., Chen, S., Chen, Y., Li, H., Yang, L., Chen, Y., and Yin, Y. (2010) Experimental and theoretical analysis of polymerization reaction process on the polydopamine membranes and its corrosion protection properties for 304 Stainless Steel, *J Mol Struct* 982, 152-161.
448. Ye, Q., Zhou, F., and Liu, W. (2011) Bioinspired catecholic chemistry for surface modification, *Chemical Society Reviews* 40, 4244-4258.
449. Łuczak, T. (2008) Preparation and characterization of the dopamine film electrochemically deposited on a gold template and its applications for dopamine sensing in aqueous solution, *Electrochimica Acta* 53, 5725-5731.
450. Burzio, L. A., and Waite, J. H. (2000) Cross-Linking in Adhesive Quinoproteins: Studies with Model Decapeptides†, *Biochemistry-Us* 39, 11147-11153.
451. Ku, S. H., Ryu, J., Hong, S. K., Lee, H., and Park, C. B. (2010) General functionalization route for cell adhesion on non-wetting surfaces, *Biomaterials* 31, 2535-2541.
452. Tsuneda, S., Ishida, T., Nishida, N., Hara, M., Sasabe, H., and Knoll, W. (1999) Tailoring of a smooth polycrystalline gold surface as a suitable anchoring site for a self-assembled monolayer, *Thin Solid Films* 339, 142-147.

453. Malitesta, C., Losito, I., Sabbatini, L., and Zambonin, P. G. (1998) Applicability of chemical derivatization - X-ray photoelectron spectroscopy (CD-XPS) to the characterization of complex matrices: case of electrosynthesized polypyrroles, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 97, 199-208.
454. Holländer, A., Pippig, F., Dubreuil, M., and Vangeneugden, D. (2008) *Distinguishing surface OH and NHx using TFAA derivatization and XPSa*, Vol. 5.
455. Johnston, E. E., and Ratner, B. D. (1996) Surface characterization of plasma deposited organic thin films, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 81, 303-317.
456. Clark, M. B., Gardella, J. A., Schultz, T. M., Patil, D. G., and Salvati, L. (1990) Solid-state analysis of eumelanin biopolymers by electron spectroscopy for chemical analysis, *Anal Chem* 62, 949-956.
457. Bernsmann, F., Frisch, B., Ringwald, C., and Ball, V. (2010) Protein adsorption on dopamine-melanin films: Role of electrostatic interactions inferred from ζ -potential measurements versus chemisorption, *J Colloid Interf Sci* 344, 54-60.
458. Desimoni, E., Casella, G. I., Morone, A., and Salvi, A. M. (1990) XPS determination of oxygen - containing functional groups on carbon - fibre surfaces and the cleaning of these surfaces, *Surf Interface Anal* 15, 627-634.
459. Geng, S., Zhang, S., and Onishi, H. (2002) XPS Applications in Thin Films Research, *Materials Technology* 17, 234-240.
460. Smith, T. (1980) The hydrophilic nature of a clean gold surface, *J Colloid Interf Sci* 75, 51-55.
461. Zhu, L.-P., Jiang, J.-H., Zhu, B.-K., and Xu, Y.-Y. (2011) Immobilization of bovine serum albumin onto porous polyethylene membranes using strongly attached polydopamine as a spacer, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86, 111-118.
462. K, K., IS, C., and Y, N. - A biofunctionalization scheme for neural interfaces using polydopamine polymer, *D - 8100316*, T - ppublish.
463. Bourmaud, A., Riviere, J., Duigou, A., Raj, G., and Baley, C. (2009) *Investigations of the use of a mussel-inspired compatibilizer to improve the matrix-fiber adhesion of a biocomposite*, Vol. 28.
464. Liu, X., Sun, K., Wu, Z., Lu, J., Song, B., Tong, W., Shi, X., and Chen, H. (2012) Facile Synthesis of Thermally Stable Poly(N-vinylpyrrolidone)-Modified Gold Surfaces by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization, *Langmuir* 28, 9451-9459.
465. Wu, Z., Chen, H., Liu, X., Zhang, Y., Li, D., and Huang, H. (2009) Protein Adsorption on Poly(N-vinylpyrrolidone)-Modified Silicon Surfaces Prepared by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization, *Langmuir* 25, 2900-2906.
466. Wu, Z., Chen, H., Li, D., and Brash, J. (2011) *Tissue plasminogen activator-containing polyurethane surfaces for fibrinolytic activity*, Vol. 7.
467. Liu, X., Tong, W., Wu, Z., and Jiang, W. (2013) Poly(N-vinylpyrrolidone)-grafted poly(dimethylsiloxane) surfaces with tunable microtopography and anti-biofouling properties, *RSC Advances* 3, 4716-4722.
468. Fan, X., Lin, L., Dalsin, J. L., and Messersmith, P. B. (2005) Biomimetic Anchor for Surface-Initiated Polymerization from Metal Substrates, *J Am Chem Soc* 127, 15843-15847.
469. Li, C. Y., Wang, W. C., Xu, F. J., Zhang, L. Q., and Yang, W. T. (2011) Preparation of pH-sensitive membranes via dopamine-initiated atom transfer radical polymerization, *J Membrane Sci* 367, 7-13.
470. Yang, W. J., Cai, T., Neoh, K.-G., Kang, E.-T., Dickinson, G. H., Teo, S. L.-M., and Rittschof, D. (2011) Biomimetic Anchors for Antifouling and Antibacterial Polymer Brushes on Stainless Steel, *Langmuir* 27, 7065-7076.
471. Wang, W. C., Wang, J., Liao, Y., Zhang, L., Cao, B., Song, G., and She, X. (2010) Surface initiated ATRP of acrylic acid on dopamine - functionalized AAO membranes, *J Appl Polym Sci* 117, 534-541.
472. Yamamoto, Y. M., Y. (1992) U.S. patent 5,098,999.

473. Gooding, J. J., and Ciampi, S. (2011) The molecular level modification of surfaces: from self-assembled monolayers to complex molecular assemblies, *Chemical Society Reviews* 40, 2704-2718.
474. Zhao, B., and Brittain, W. J. (2000) Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules, *Prog Polym Sci* 25, 677-710.
475. Zajac, R., and Chakrabarti, A. (1995) Irreversible polymer adsorption from semidilute and moderately dense solutions, *Physical Review E* 52, 6536-6549.
476. Ito, Y., Ochiai, Y., Soon Park, Y., and Imanishi, Y. (1997) *pH-Sensitive Gating by Conformational Change of a Polypeptide Brush Grafted onto a Porous Polymer Membrane*, Vol. 119.
477. Bai, J., Shi, Z., and Yin, J. (2013) A novel main chain benzoxazine polymer with the ability of UV-induced self-surface modification, *Polymer* 54, 2498-2505.
478. Wang, Y., Su, T. J., Green, R., Tang, Y., Styrkas, D., Danks, T. N., Bolton, R., and Lu, J. R. (2000) Covalent coupling of an phospholipid monolayer on the surface of ceramic materials, *Chemical Communications*, 587-588.
479. Prucker, O., and R  he, J. (1998) *Synthesis of Poly(styrene) Monolayers Attached to High Surface Area Silica Gels through Self-Assembled Monolayers of Azo Initiators*, Vol. 31.
480. Álvarez-Paino, M., Marcelo, G., Muñoz-Bonilla, A., and Fernández-García, M. (2013) Catecholic Chemistry To Obtain Recyclable and Reusable Hybrid Polymeric Particles as Catalytic Systems, *Macromolecules* 46, 2951-2962.
481. Muñoz - Bonilla, A., Marcelo, G., Casado, C., Teran, F. J., and Fernández - García, M. (2012) Preparation of glycopolymer - coated magnetite nanoparticles for hyperthermia treatment, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 50, 5087-5096.
482. Thomas, V., and Jayabalan, M. (2009) A new generation of high flex life polyurethane urea for polymer heart valve--studies on in vivo biocompatibility and biodurability, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 89, 192-205.
483. Ratner, B. D. (2007) The catastrophe revisited: blood compatibility in the 21st Century, *Biomaterials* 28, 5144-5147.
484. Aksoy, A. E., Hasirci, V., and Hasirci, N. (2008) Surface Modification of Polyurethanes with Covalent Immobilization of Heparin, *Macromolecular Symposia* 269, 145-153.
485. Kim, S. W., and Jacobs, H. (1996) Design of nonthrombogenic polymer surfaces for blood-contacting medical devices, *Blood Purif* 14, 357-372.
486. Ishihara, K., Aragaki, R., Ueda, T., Watanabe, A., and Nakabayashi, N. (1990) Reduced thrombogenicity of polymers having phospholipid polar groups, *J Biomed Mater Res* 24, 1069-1077.
487. Ishihara, K., Ziats, N. P., Tierney, B. P., Nakabayashi, N., and Anderson, J. M. (1991) PROTEIN ADSORPTION FROM HUMAN PLASMA IS REDUCED ON PHOSPHOLIPID POLYMERS, *J Biomed Mater Res* 25, 1397-1407.
488. Ishihara, K., Oshida, H., Endo, Y., Ueda, T., Watanabe, A., and Nakabayashi, N. (1992) Hemocompatibility of human whole blood on polymers with a phospholipid polar group and its mechanism, *J Biomed Mater Res* 26, 1543-1552.
489. Sugiyama, K., Ohga, K., and Aoki, H. (1995) Emulsion copolymerization of 2 - (acryloyloxy)ethylphosphoryl - choline with vinyl monomers and protein adsorption at resultant copolymer microspheres, *Macromol Chem Phys* 196, 1907-1916.
490. Oishi, T., Uchiyama, H., Onimura, K., and Tsutsumi, H. (1998) Synthesis and Properties of Poly(methacrylate) Bearing a Phosphorylcholine Analogous Group, *Polym J* 30, 17.
491. L. Ruiz, J. G. H., D. L  onard, J. Mathieu. (1998) Synthesis, structure and surface dynamics of phosphorylcholine functional biomimicking polymers., *Biomaterials* 19, 987-998.
492. Liu, G., Hu, X., Chen, C., and Ji, J. (2010) Construct biomimetic giant vesicles via self-assembly of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-block-poly(D,L-lactide), *J Appl Polym Sci* 118, 3197-3202.

493. Yuan, Y. L., Ai, F., Zhang, J., Zang, X. B., Shen, J., and Lin, S. C. (2002) Grafting sulfobetaine monomer onto the segmented poly(ether-urethane) surface to improve hemocompatibility, *J Biomater Sci Polym Ed* 13, 1081-1092.
494. Chang, Y., Chen, S., Yu, Q., Zhang, Z., Bernards, M., and Jiang, S. (2007) Development of biocompatible interpenetrating polymer networks containing a sulfobetaine-based polymer and a segmented polyurethane for protein resistance, *Biomacromolecules* 8, 122-127.
495. Yang, S., Zhang, S.-P., Winnik, F. M., Mwale, F., and Gong, Y.-K. (2008) Group reorientation and migration of amphiphilic polymer bearing phosphorylcholine functionalities on surface of cellular membrane mimicking coating, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 84A, 837-841.
496. Ishihara, K., Fukumoto, K., Iwasaki, Y., and Nakabayashi, N. (1999) Modification of polysulfone with phospholipid polymer for improvement of the blood compatibility. Part 2. Protein adsorption and platelet adhesion, *Biomaterials* 20, 1553-1559.
497. Ishihara, K., Aragaki, R., Ueda, T., Watanabe, A., and Nakabayashi, N. (1990) Reduced thrombogenicity of polymers having phospholipid polar groups, *J Biomed Mater Res* 24, 1069-1077.
498. Ho, S. P., Nakabayashi, N., Iwasaki, Y., Boland, T., and LaBerge, M. (2003) Frictional properties of poly(MPC-co-BMA) phospholipid polymer for catheter applications, *Biomaterials* 24, 5121-5129.
499. Iwasaki, Y., and Ishihara, K. (2005) Phosphorylcholine-containing polymers for biomedical applications, *Anal Bioanal Chem* 381, 534-546.
500. Kohler, A. S., Parks, P. J., Mooradian, D. L., Rao, G. H., and Furcht, L. T. (1996) Platelet adhesion to novel phospholipid materials: modified phosphatidylcholine covalently immobilized to silica, polypropylene, and PTFE materials, *J Biomed Mater Res* 32, 237-242.
501. Chen, S., Yu, F., Yu, Q., He, Y., and Jiang, S. (2006) Strong Resistance of a Thin Crystalline Layer of Balanced Charged Groups to Protein Adsorption, *Langmuir* 22, 8186-8191.
502. McKee, M. G., Layman, J. M., Cashion, M. P., and Long, T. E. (2006) Phospholipid nonwoven electrospun membranes, *Science* 311, 353-355.
503. Chapman, D. (1993) Biomembranes and new hemocompatible materials, *Langmuir* 9, 39-45.
504. <https://socratic.org/questions/what-is-the-function-of-phospholipids-in-the-cell-membrane>.
505. Kuiper, K. K. J., and Nordrehaug, J. E. (2000) Early mobilization after protamine reversal of heparin following implantation of phosphorylcholine-coated stents in totally occluded coronary arteries, *Am. J. Cardiol.* 85, 698-702.
506. Ishihara, K., Nomura, H., Mihara, T., Kurita, K., Iwasaki, Y., and Nakabayashi, N. (1998) Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption?, *J Biomed Mater Res* 39, 323-330.
507. Kitano, H. (2003) Structure of water in the vicinity of phospholipid analogue copolymers as studied by vibrational spectroscopy, *Langmuir* 19, 10260-10266.
508. Feng, W., Brash, J. L., and Zhu, S. (2006) Non-biofouling materials prepared by atom transfer radical polymerization grafting of 2-methacryloxyethyl phosphorylcholine: Separate effects of graft density and chain length on protein repulsion, *Biomaterials* 27, 847-855.
509. Du, J., Liu, X., Liu, W., Wu, Z., and Chen, H. (2014) One-step preparation of vinyl-functionalized material surfaces: a versatile platform for surface modification, *Science China Chemistry* 57, 654-660.
510. Goda, T., Konno, T., Takai, M., Moro, T., and Ishihara, K. (2006) Biomimetic phosphorylcholine polymer grafting from polydimethylsiloxane surface using photo-induced polymerization, *Biomaterials* 27, 5151-5160.
511. Moro, T., Takatori, Y., Ishihara, K., Konno, T., Takigawa, Y., Matsushita, T., Chung, U.-i., Nakamura, K., and Kawaguchi, H. (2004) Surface grafting of

- artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis, *Nature Materials* 3, 829.
512. Moro, T., Takatori, Y., Kyomoto, M., Ishihara, K., Saiga, K., Nakamura, K., and Kawaguchi, H. (2010) Surface grafting of biocompatible phospholipid polymer MPC provides wear resistance of tibial polyethylene insert in artificial knee joints, *Osteoarthritis and Cartilage* 18, 1174-1182.
 513. Moro, T., Kawaguchi, H., Ishihara, K., Kyomoto, M., Karita, T., Ito, H., Nakamura, K., and Takatori, Y. (2009) Wear resistance of artificial hip joints with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) grafted polyethylene: Comparisons with the effect of polyethylene cross-linking and ceramic femoral heads, *Biomaterials* 30, 2995-3001.
 514. Kyomoto, M., Moro, T., Saiga, K.-i., Miyaji, F., Kawaguchi, H., Takatori, Y., Nakamura, K., and Ishihara, K. (2010) Lubricity and stability of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) polymer layer on Co-Cr-Mo surface for hemi-arthroplasty to prevent degeneration of articular cartilage, *Biomaterials* 31, 658-668.
 515. Tatsuro, G., Peter, K., Kazuhiko, I., Agneta, R. D., and Yuji, M. (2014) Biomimetic Interfaces Reveal Activation Dynamics of C-Reactive Protein in Local Microenvironments, *Advanced Healthcare Materials* 3, 1733-1738.
 516. Parhi, R. (2016) Development and optimization of pluronic® F127 and HPMC based thermosensitive gel for the skin delivery of metoprolol succinate, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 36, 23-33.
 517. Champeau, M., Póvoa, V., Militão, L., Cabrini, F. M., Picheth, G. F., Meneau, F., Jara, C. P., de Araujo, E. P., and de Oliveira, M. G. (2018) Supramolecular poly(acrylic acid)/F127 hydrogel with hydration-controlled nitric oxide release for enhancing wound healing, *Acta Biomaterialia* 74, 312-325.
 518. Vandenhaute, M., Snoeck, D., Vanderleyden, E., De Belie, N., Van Vlierberghe, S., and Dubrue, P. (2017) Stability of Pluronic® F127 bismethacrylate hydrogels: Reality or utopia?, *Polym Degrad Stabil* 146, 201-211.
 519. Wang, Y., Miao, Y., Zhang, J., Wu, J. P., Kirk, T. B., Xu, J., Ma, D., and Xue, W. (2018) Three-dimensional printing of shape memory hydrogels with internal structure for drug delivery, *Materials Science and Engineering: C* 84, 44-51.
 520. Ruel-Gariépy, E., and Leroux, J.-C. (2004) In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems, *Eur J Pharm Biopharm* 58, 409-426.
 521. Yap, L.-S., and Yang, M.-C. (2016) Evaluation of hydrogel composing of Pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan as injectable scaffold for tissue engineering applications, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 146, 204-211.
 522. Zheng, Y., Lv, H., Wang, Y., Lu, H., Qing, L., and Xi, T. (2009) *Performance of novel bioactive hybrid hydrogels in vitro and in vivo used for artificial cartilage*, Vol. 4.
 523. Diniz, I. M. A., Chen, C., Xu, X., Ansari, S., Zadeh, H. H., Marques, M. M., Shi, S., and Moshaverinia, A. (2015) Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 26, 153.
 524. Monroy, A., Kojima, K., Ghanem, M. A., Paz, A. C., Kamil, S., Vacanti, C. A., and Eavey, R. D. (2007) Tissue engineered cartilage “bioshell” protective layer for subcutaneous implants, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 71, 547-552.
 525. Saim, A. B., Cao, Y., Weng, Y., Chang, C.-N., Vacanti, M. A., Vacanti, C. A., and Eavey, R. D. (2000) Engineering Autogenous Cartilage in the Shape of a Helix Using an Injectable Hydrogel Scaffold, *The Laryngoscope* 110, 1694-1697.
 526. Lee, H., and Park, T. G. (2009) Photo-crosslinkable, biomimetic, and thermo-sensitive pluronic grafted hyaluronic acid copolymers for injectable delivery of chondrocytes, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 88A, 797-806.
 527. Vinatier, C., Magne, D., Weiss, P., Trojani, C., Rochet, N., Carle, G. F., Vignes-Colombeix, C., Chadjiachristos, C., Galera, P., Daculsi, G., and Guicheux, J. (2005)

- A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes, *Biomaterials* 26, 6643-6651.
528. Van Tomme, S. R., Storm, G., and Hennink, W. E. (2008) In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications, *Int J Pharm* 355, 1-18.
 529. Fowler, E. B., Cuenin, M. F., Hokett, S. D., Peacock, M. E., McPherson, J. C., Dirksen, T. R., Sharawy, M., and Billman, M. A. (2002) Evaluation of Pluronic Polyols as Carriers for Grafting Materials: Study in Rat Calvaria Defects, *Journal of Periodontology* 73, 191-197.
 530. Bensaïd, W., Triffitt, J. T., Blanchat, C., Oudina, K., Sedel, L., and Petite, H. (2003) A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation, *Biomaterials* 24, 2497-2502.
 531. Huang, J.-W., Chen, W.-J., Liao, S.-K., Yang, C.-Y., Lin, S.-S., and Wu, C.-C. (2006) Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in A carrier system of Pluronic F127 and Interpore, *Chang Gung Med J* 29, 363-372.
 532. Yu, H., Yang, X., Cheng, J., Wang, X., and Shen, S. G. Distraction Osteogenesis Combined With Tissue-Engineered Cartilage in the Reconstruction of Condylar Osteochondral Defect, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 69, e558-e564.
 533. Brunet-Maheu, J.-M., Fernandes, J. C., Lacerda, C. A. D., Shi, Q., Benderdour, M., and Lavigne, P. (2009) Pluronic F-127 as a Cell Carrier for Bone Tissue Engineering, *Journal of Biomaterials Applications* 24, 275-287.
 534. Jung, H. H., Park, K., and Han, D. K. (2010) Preparation of TGF- β 1-conjugated biodegradable pluronic F127 hydrogel and its application with adipose-derived stem cells, *J Control Release* 147, 84-91.
 535. Heilmann, S., Küchler, S., Wischke, C., Lendlein, A., Stein, C., and Schäfer-Korting, M. (2013) A thermosensitive morphine-containing hydrogel for the treatment of large-scale skin wounds, *Int J Pharm* 444, 96-102.
 536. Mosmann, T. (1983) RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL - APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTO-TOXICITY ASSAYS, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
 537. Ciapetti, G., Cenni, E., Pratelli, L., and Pizzoferrato, A. (1993) INVITRO EVALUATION OF CELL BIOMATERIAL INTERACTION BY MTT ASSAY, *Biomaterials* 14, 359-364.
 538. Hansen, M. B., Nielsen, S. E., and Berg, K. (1989) RE-EXAMINATION AND FURTHER DEVELOPMENT OF A PRECISE AND RAPID DYE METHOD FOR MEASURING CELL-GROWTH CELL KILL, *J. Immunol. Methods* 119, 203-210.
 539. Lippens, E., Swennen, I., Gironès, J., Declercq, H., Vertenten, G., Vlamincx, L., Gasthuys, F., Schacht, E., and Cornelissen, R. (2011) Cell survival and proliferation after encapsulation in a chemically modified Pluronic((R)) F127 hydrogel, *Journal of Biomaterials Applications* 27.
 540. SF, K., SR, B., and SC, R. - Pluronic F127 as a cell encapsulation material: utilization of, *D - 9505538*, T - ppublish.
 541. Chen, Y., Zhang, W., Huang, Y., Gao, F., and Fang, X. (2015) Dual-functional c(RGDyK)-decorated Pluronic micelles designed for antiangiogenesis and the treatment of drug-resistant tumor, *Int J Nanomedicine* 10, 4863-4881.
 542. Lawrence, W. H., Bass, G. E., Purcell, W. P., and Autian, J. (1972) Use of mathematical models in the study of structure-toxicity relationships of dental compounds. I. Esters of acrylic and methacrylic acids, *J Dent Res* 51, 526-535.
 543. Bass, G. E., Lawrence, W. H., Purcell, W. P., and Autian, J. (1974) Further Evaluation of a Quantitative Mathematical Model for Predicting Acute Toxicity of Acrylate and Methacrylate Esters, *J Dent Res* 53, 756-756.
 544. Dillingham, E. O., Lawrence, W. H., Autian, J., and Schmalz, G. (1983) Acrylate and methacrylate esters: relationship of hemolytic activity and in vivo toxicity, *J Biomed Mater Res* 17, 945-957.
 545. Lee, S.-Y., and Tae, G. (2007) Formulation and in vitro characterization of an in situ gelable, photo-polymerizable Pluronic hydrogel suitable for injection, *J Control Release* 119, 313-319.

546. MacDonald, R. I. (1985) Membrane fusion due to dehydration by polyethylene glycol, dextran, or sucrose, *Biochemistry-U.S.* 24, 4058-4066.
547. Kuo, J.-H. S. (2003) Effect of Pluronic-block copolymers on the reduction of serum-mediated inhibition of gene transfer of polyethyleneimine–DNA complexes, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37, 267-271.
548. Liu, F., Yang, J., Huang, L., and Liu, D. (1996) Effect of Non-Ionic Surfactants on the Formation of DNA/Emulsion Complexes and Emulsion-Mediated Gene Transfer, *Pharmaceutical Research* 13, 1642-1646.
549. Melik-Nubarov, N. S., Pomaz, O. O., Dorodnych, T. Y., Badun, G. A., Ksenofontov, A. L., Schemchukova, O. B., and Arzhakov, S. A. (1999) Interaction of tumor and normal blood cells with ethylene oxide and propylene oxide block copolymers, *FEBS Letters* 446, 194-198.
550. Kabanov, A. V., Slepnev, V. I., Kuznetsova, L. E., Batrakova, E. V., Alakhov, V. Y., Meliknubarov, N. S., Sveshnikov, P. G., and Kabanov, V. A. (1992) Pluronic Micelles as a Tool for Low-Molecular Compound Vector Delivery into a Cell - Effect of Staphylococcus-Aureus Enterotoxin-B on Cell Loading with Micelle Incorporated Fluorescent Dye, *Biochem Int* 26, 1035-1042.
551. Slepnev, V. I., Kuznetsova, L. E., Gubin, A. N., Batrakova, E. V., Alakhov, V. Y., and Kabanov, A. V. (1992) Micelles of Poly(Oxyethylene)-Poly(Oxypropylene) Block Copolymer (Pluronic) as a Tool for Low-Molecular Compound Delivery into a Cell - Phosphorylation of Intracellular Proteins with Micelle Incorporated [γ -³²p]Atp1, *Biochem Int* 26, 587-595.
552. Meng, X., Liu, J., Yu, X., Li, J., Lu, X., and Shen, T. (2017) Pluronic F127 and D- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate (TPGS) Mixed Micelles for Targeting Drug Delivery across The Blood Brain Barrier, *Scientific Reports* 7, 2964.
553. Kabanov, A. V., Chekhonin, V. P., Alakhov, V. Y., Batrakova, E. V., Lebedev, A. S., Melik-Nubarov, N. S., Arzhakov, S. A., Levashov, A. V., Morozov, G. V., Severin, E. S., and Kabanov, V. A. (1989) The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles: Micelles as microcontainers for drug targeting, *FEBS Letters* 258, 343-345.
554. Freshney, R. I. (2000) References, In *Culture of Animal Cells*, pp 105-116, John Wiley & Sons, Inc.
555. Daly, M. M., and Knorr, D. (1988) Chitosan-Alginate Complex Coacervate Capsules: Effects of Calcium Chloride, Plasticizers, and Polyelectrolytes on Mechanical Stability, *Biotechnol Progr* 4, 76-81.
556. Nassif, N., Bouvet, O., Noelle Rager, M., Roux, C., Coradin, T., and Livage, J. (2002) Living bacteria in silica gels, *Nature Materials* 1, 42.
557. Billiet, T., Vandenhaute, M., Schelfhout, J., Van Vlierberghe, S., and Dubruel, P. (2012) A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering, *Biomaterials* 33, 6020-6041.
558. Billiet, T., Vandenhaute, M., Schelfhout, J., Van Vlierberghe, S., and Dubruel, P. (2013) Exploring the Future of Hydrogels in Rapid Prototyping: A Review on Current Trends and Limitations, In *Biologically Responsive Biomaterials for Tissue Engineering* (Antoniac, I., Ed.), pp 201-249, Springer New York, New York, NY.
559. Landers, R., Pfister, A., Hubner, U., John, H., Schmelzeisen, R., and Mülhaupt, R. (2002) Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques, *Journal of Materials Science* 37, 3107-3116.
560. Landers, R., Hübner, U., Schmelzeisen, R., and Mülhaupt, R. (2002) Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering, *Biomaterials* 23, 4437-4447.
561. Moroni, L., de Wijn, J. R., and van Blitterswijk, C. A. (2006) 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties, *Biomaterials* 27, 974-985.
562. Bai, X., Lü, S., Cao, Z., Ni, B., Wang, X., Ning, P., Ma, D., Wei, H., and Liu, M. (2017) Dual crosslinked chondroitin sulfate injectable hydrogel formed via continuous Diels-Alder (DA) click chemistry for bone repair, *Carbohydr Polym* 166, 123-130.

563. Shirwaiker, R., Purser, M., and Wysk, R. (2014) Scaffolding hydrogels for rapid prototyping based tissue engineering, pp 176-200.
564. Gioffredi, E., Boffito, M., Calzone, S., Giannitelli, S. M., Rainer, A., Trombetta, M., Mozetic, P., and Chiono, V. (2016) Pluronic F127 Hydrogel Characterization and Biofabrication in Cellularized Constructs for Tissue Engineering Applications, *Procedia CIRP* 49, 125-132.
565. Kolan, K., Liu, Y., Baldrige, J., Murphy, C., Semon, J., Day, D., and Leu, M. (2017) Solvent Based 3D Printing of Biopolymer/Bioactive Glass Composite and Hydrogel for Tissue Engineering Applications, *Procedia CIRP* 65, 38-43.
566. Dai, W., Guo, H., Gao, B., Ruan, M., Xu, L., Wu, J., Brett Kirk, T., Xu, J., Ma, D., and Xue, W. (2019) Double network shape memory hydrogels activated by near-infrared with high mechanical toughness, nontoxicity, and 3D printability, *Chemical Engineering Journal* 356, 934-949.
567. Maher, P. S., Keatch, R. P., Donnelly, K., Mackay, R. E., and Paxton, J. Z. (2009) Construction of 3D biological matrices using rapid prototyping technology, *Rapid Prototyping Journal* 15, 204-210.
568. Higuchi, A., Aoki, N., Yamamoto, T., Miyazaki, T., Fukushima, H., Tak, T. M., Jyujyoji, S., Egashira, S., Matsuoka, Y., and Natori, S. H. (2006) Temperature-induced cell detachment on immobilized pluronic surface, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 79, 380-392.
569. Cortiella, J., Nichols, J. E., Kojima, K., Bonassar, L. J., Dargon, P., Roy, A. K., Vacant, M. P., Niles, J. A., and Vacanti, C. A. (2006) Tissue-engineered lung: An in vivo and in vitro comparison of polyglycolic acid and pluronic F-127 hydrogel/somatic lung progenitor cell constructs to support tissue growth, *Tissue Engineering* 12, 1213-1225.
570. Lewis, P. L., Yan, M., Su, J., and Shah, R. N. (2019) Directing the growth and alignment of biliary epithelium within extracellular matrix hydrogels, *Acta Biomaterialia* 85, 84-93.
571. Kolesky, D. B., Truby, R. L., Gladman, A. S., Busbee, T. A., Homan, K. A., and Lewis, J. A. (2014) 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs, *Advanced Materials* 26, 3124-3130.
572. Panwar, A., and Tan, L. P. (2016) Current Status of Bioinks for Micro-Extrusion-Based 3D Bioprinting, *Molecules* 21.
573. Chang, C. C., Boland, E. D., Williams, S. K., and Hoying, J. B. (2011) Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 98, 160-170.
574. Fedorovich, N. E., Oudshoorn, M. H., van Geemen, D., Hennink, W. E., Alblas, J., and Dhert, W. J. A. (2009) The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels, *Biomaterials* 30, 344-353.
575. Fedorovich, N. E., Swennen, I., Girones, J., Moroni, L., van Blitterswijk, C. A., Schacht, E., Alblas, J., and Dhert, W. J. A. (2009) Evaluation of Photocrosslinked Lutrol Hydrogel for Tissue Printing Applications, *Biomacromolecules* 10, 1689-1696.
576. Fedorovich, N. E., Alblas, J., de Wijn, J. R., Hennink, W. E., Verbout, A. J., and Dhert, W. J. A. (2007) Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing, *Tissue Engineering* 13, 1905-1925.
577. Fedorovich, N. E., Dewijn, J. R., Verbout, A. J., Alblas, J., and Dhert, W. J. A. (2008) Three-dimensional fiber deposition of cell-laden, viable, patterned constructs for bone tissue printing, *Tissue Engineering Part A* 14, 127-133.
578. Müller, M., Becher, J., Schnabelrauch, M., and Zenobi-Wong, M. (2015) Nanostructured Pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting, *Biofabrication* 7, 035006.
579. Smith, C. M., Stone, A. L., Parkhill, R. L., Stewart, R. L., Simpkins, M. W., Kachurin, A. M., Warren, W. L., and Williams, S. K. (2004) Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs, *Tissue Eng* 10, 1566-1576.

580. Melchels, F. P. W., Blokzijl, M. M., Levato, R., Peiffer, Q. C., de Ruijter, M., Hennink, W. E., Vermonden, T., and Malda, J. (2016) Hydrogel-based reinforcement of 3D bioprinted constructs, *Biofabrication* 8, 035004.
581. Strobl, G. R. (1996) *The physics of polymers : concepts for understanding their structures and behavior*, Springer Verlag, Berlin ; London.
582. Hadjichristidis, N., Pitsikalis, M., Iatrou, H., Driva, P., Sakellariou, G., and Chatzichristidi, M. (2012) 6.03 - Polymers with Star-Related Structures: Synthesis, Properties, and Applications A2 - Matyjaszewski, Krzysztof, In *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (Möller, M., Ed.), pp 29-111, Elsevier, Amsterdam.
583. Lapienis, G. (2009) Star-shaped polymers having PEO arms, *Prog Polym Sci* 34, 852-892.
584. Fetters, L. J., Kiss, A. D., Pearson, D. S., Quack, G. F., and Vitus, F. J. (1993) Rheological behavior of star-shaped polymers, *Macromolecules* 26, 647-654.
585. Meinel, L., Karageorgiou, V., Fajardo, R., Snyder, B., Shinde-Patil, V., Zichner, L., Kaplan, D., Langer, R., and Vunjak-Novakovic, G. (2004) Bone Tissue Engineering Using Human Mesenchymal Stem Cells: Effects of Scaffold Material and Medium Flow, *Annals of Biomedical Engineering* 32, 112-122.
586. Lin, A. S., Barrows, T. H., Cartmell, S. H., and Guldberg, R. E. (2003) Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds, *Biomaterials* 24, 481-489.
587. Ho, S. T., and Hutmacher, D. W. (2006) A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds, *Biomaterials* 27, 1362-1376.
588. Jones, A. C., Arns, C. H., Sheppard, A. P., Hutmacher, D. W., Milthorpe, B. K., and Knackstedt, M. A. (2007) Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT, *Biomaterials* 28, 2491-2504.
589. Giesche, H. (2006) Mercury Porosimetry: A General (Practical) Overview, *Particle & Particle Systems Characterization* 23, 9-19.
590. Bertoldi, S., Fare, S., and Tanzi, M. C. (2011) Assessment of scaffold porosity: the new route of micro-CT, *J Appl Biomater Biomech* 9, 165-175.
591. Cengiz, I. F., Oliveira, J. M., and Reis, R. L. (2018) Micro-CT - a digital 3D microstructural voyage into scaffolds: a systematic review of the reported methods and results, *Biomater Res* 22, 26-26.
592. Guldberg, R. E., Duvall, C. L., Peister, A., Oest, M. E., Lin, A. S. P., Palmer, A. W., and Levenston, M. E. (2008) 3D imaging of tissue integration with porous biomaterials, *Biomaterials* 29, 3757-3761.
593. Bruckschen, B., Seitz, H., Buzug, T., Tille, C., Leukers, B., and Irsen, S. (2005) Comparing Different Porosity Measurement Methods for Characterisation of 3D Printed Bone Replacement Scaffolds, *Biomedizinische Technik* 50.
594. Wade, R. J., and Burdick, J. A. (2014) Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly, *Nano Today* 9, 722-742.
595. Homburg, S., Grimmelsmann, N., and Ehrmann, A. (2016) *Needleless electrospinning of pure and blended chitosan*.
596. Grothe, T., Großerhede, C., Hauser, T., Kern, P., Stute, K., and Ehrmann, A. (2017) Needleless electrospinning of PEO nanofiber mats, In *Second International Conference on Mechanics, Materials and Structural Engineering (ICMMSE 2017)*, Atlantis Press.
597. Shabafrooz, V., Mozafari, M., Vashaei, D., and Tayebi, L. (2014) Electrospun nanofibers: from filtration membranes to highly specialized tissue engineering scaffolds, *J Nanosci Nanotechnol* 14, 522-534.
598. Formo, E., Lee, E., Campbell, D., and Xia, Y. (2008) Functionalization of electrospun TiO₂ nanofibers with Pt nanoparticles and nanowires for catalytic applications, *Nano Lett* 8, 668-672.
599. Zong, X., Bien, H., Chung, C. Y., Yin, L., Fang, D., Hsiao, B. S., Chu, B., and Entcheva, E. (2005) Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs, *Biomaterials* 26, 5330-5338.

600. Li, C., Vepari, C., Jin, H. J., Kim, H. J., and Kaplan, D. L. (2006) Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27, 3115-3124.
601. Yang, F., Murugan, R., Wang, S., and Ramakrishna, S. (2005) Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials* 26, 2603-2610.
602. Dong, B., Arnoult, O., Smith, M. E., and Wnek, G. E. (2009) Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds from benign solvents, *Macromol Rapid Commun* 30, 539-542.
603. Min, B. M., Lee, G., Kim, S. H., Nam, Y. S., Lee, T. S., and Park, W. H. (2004) Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro, *Biomaterials* 25, 1289-1297.
604. Ji, Y., Ghosh, K., Shu, X. Z., Li, B., Sokolov, J. C., Prestwich, G. D., Clark, R. A., and Rafailovich, M. H. (2006) Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds, *Biomaterials* 27, 3782-3792.
605. Son, W.-K., Ho Youk, J., Seung Lee, T., and Park, W. H. (2004) *The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers*, Vol. 45.
606. Kim, S. H., Kim, S.-H., Nair, S., and Moore, E. (2005) Reactive Electrospinning of Cross-Linked Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Nanofibers and Elastic Properties of Individual Hydrogel Nanofibers in Aqueous Solutions, *Macromolecules* 38, 3719-3723.
607. Zhang, Y., Lei, Y., Chang, J., Li, L., He, B., and Gu, Z. (2012) Guidance of myoblast migration on aligned electrospun PLGA nanofibrous meshes, *Materials Letters* 68, 218-221.
608. Shin, M., Ishii, O., Sueda, T., and Vacanti, J. P. (2004) Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh, *Biomaterials* 25, 3717-3723.
609. Huang, Z.-M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., and Ramakrishna, S. (2003) A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Composites Science and Technology* 63, 2223-2253.
610. Persano, L., Camposeo, A., Tekmen, C., and Pisignano, D. (2013) Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review, *Macromolecular Materials and Engineering* 298, 504-520.
611. Agarwal, S., Wendorff, J. H., and Greiner, A. (2008) Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polymer* 49, 5603-5621.
612. Jiang, T., Carbone, E. J., Lo, K. W. H., and Laurencin, C. T. (2015) Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration, *Prog Polym Sci* 46, 1-24.
613. Senthamizhan, A., Balusamy, B., and Uyar, T. (2016) Glucose sensors based on electrospun nanofibers: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 1285-1306.
614. Sill, T. J., and von Recum, H. A. (2008) Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials* 29, 1989-2006.
615. Saracino, G., Cigognini, D., Silva, D., Caprini, A., and Gelain, F. (2012) *Nanomaterials Design and Tests for Neutral Tissue Engineering*, Vol. 42.
616. Bhattacharjee, A., Kumar, K., Arora, A., and Katti, D. S. (2016) Fabrication and characterization of Pluronic modified poly(hydroxybutyrate) fibers for potential wound dressing applications, *Materials Science and Engineering: C* 63, 266-273.
617. Xu, X., Liu, J., Sheng, G., Chen, R., Zhao, J., Liu, X., Shi, Q., and Yin, J. (2018) Construction of anti-thrombotic and anti-oxidative surfaces with elastomer/Pluronic F127 assembled microfibers, *Applied Surface Science* 451, 76-85.
618. Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D., and Beck Tan, N. C. (2001) The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer* 42, 261-272.
619. Grothe, T., Brikmann, J., Meissner, H., and Ehrmann, A. (2017) Influence of Solution and Spinning Parameters on Nanofiber Mat Creation of Poly(ethylene oxide) by Needleless Electrospinning, *Materials Science* 23, 342-349.

620. El-Aassar, M. R., El fawal, G. F., El-Deeb, N. M., Hassan, H. S., and Mo, X. (2016) Electrospun Polyvinyl Alcohol/ Pluronic F127 Blended Nanofibers Containing Titanium Dioxide for Antibacterial Wound Dressing, *Appl Biochem Biotech* 178, 1488-1502.
621. Pan, J.-f., Liu, N.-h., Sun, H., and Xu, F. (2014) Preparation and Characterization of Electrospun PLCL/Poloxamer Nanofibers and Dextran/Gelatin Hydrogels for Skin Tissue Engineering, *Plos One* 9, e112885.
622. Li, W., Hu, Y., Shi, L., Zhang, X., Xiong, L., Zhang, W., and Ullah, I. (2018) Electrospinning of Polycaprolactone/Pluronic F127 dissolved in glacial acetic acid: fibrous scaffolds fabrication, characterization and in vitro evaluation, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 29, 1155-1167.
623. Wu, B., Li, S., Shi, J., Vijayavenkataraman, S., Lu, W. F., Trau, D., and Fuh, J. Y. H. (2018) Homogeneous cell printing on porous PCL/F127 tissue engineering scaffolds, *Bioprinting* 12, e00030.
624. Gu, J., Ninghua, L., Yang, X., Feng, Z., and Qi, F. (2014) Adiposed-derived stem cells seeded on PLCL/P123 eletrospun nanofibrous scaffold enhance wound healing, *Biomedical Materials* 9, 035012.
625. Qu, J., Zhao, X., Liang, Y., Zhang, T., Ma, P. X., and Guo, B. (2018) Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing, *Biomaterials* 183, 185-199.
626. Wong, R. S., Ashton, M., and Dodou, K. (2015) Effect of Crosslinking Agent Concentration on the Properties of Unmedicated Hydrogels, *Pharmaceutics* 7, 305-319.
627. Gómez-Mascaraque, L., Perez-Masia, R., González-Barrio, R., Periago, M. J., and López-Rubio, A. (2017) Potential of microencapsulation through emulsion-electrospraying to improve the bioaccessibility of β -carotene, *Food Hydrocolloids* 73, 1-12.
628. Li, C., Wang, F., Ge, P., Mao, Y., and Wang, L. (2017) Anti-acute thrombogenic surface using coaxial electrospraying coating for vascular graft application, *Materials Letters* 205, 15-19.

XI Lijst van publicaties.

Artikels

1. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. Review article. Biomaterials, Volume 33, Issue 26, September 2012, Pages 6020-6041. Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P.

2. Elektromagnetic stimulation to optimize the bone regeneration capacity of gelatin-based cryogels. International journal of immunopathology and pharmacology. Volume 25, Issue 1, January-March 2012, Pages 165-174. Fassina L, Saino E, Visai L, Schelfhout J, Dierick M, Van Hoorebeke L, Dubruel P, Benazzo F, Magenes G, Van Vlierberghe S.

3. Cross-linkable, thermo-responsive Pluronic® building blocks for biomedical applications: synthesis and physico-chemical evaluation. European polymer journal, Volume 53, April 2014, Pages 126-138. Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Mendes E, Dubruel P.

Boekhoofdstuk

Exploring the future of hydrogels in rapid prototyping: a review on current trends and limitations. from book Biologically Responsive Biomaterials for Tissue Engineering, USA by Springer, August 2013, Pages 201-249. Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P.

Patent

Composite materials for fibres, membranes and textile coatings and method for its preparation. WO 2011138030 A3 Also published as: EP2567009A2, EP2567009B1, US9062194, US20130109773, WO2011138030A2. Hebbrecht G, Dubruel P, Vanneste M, Laperre J, Schacht E, Schelfhout J.

Congresdeelnames

1. **Doctoraatssymposium UGent, 2009, België.**
Poster. Development of porous draagstructuren for myocardial tissue engineering by rapid prototyping techniques. Schelfhout J, Dubruel P.
2. **ESB - European Conference on Biomaterials, 2010, Finland.**
Poster. Development of photopolymerizable 3D hydrogel draagstructuren for tissue engineering purposes. Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P, Berneel E, Cornelissen M.
3. **BPG Annual Meeting, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012 en 2013, België.**
2009 – Poster: Fabrication of porous draagstructuren for myocardial tissue engineering by rapid prototyping techniques. Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Schacht E, Dubruel P.
2010 – Poster: Development of photopolymerizable hydrogels for 3D draagstructuren by rapid prototyping. Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Cornelissen M, Berneel E, Dubruel P.
2011 – Poster: Hydrogels as promising materials for producing 3D porous tissue engineering draagstructuren.
2012 – Presentatie: End-capped Pluronics® as building blocks for 3D tissue engineering draagstructuren.
2013 – Poster: Photopolymerizable, end-capped Pluronics® as building blocks for soft tissue biodraagstructuren.
4. **i-SUP - Industry & innovative sustainable production, 2010, België.**
Presentatie. A tissue engineering approach to meniscus regeneration by rapid prototyping techniques. Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Schacht E, Dubruel P.
5. **ESB – European Conference on Biomaterials, 2010, Finland.**
Poster. Development of photopolymerizable hydrogels for 3D biodraagstructuren by rapid prototyping. Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Schacht E, Cornelissen M, Berneel E, Dubruel P.
6. **NCMB – Belgian Day on Biomedical Engineering, 2010, Brussel.**
Poster. Development of photopolymerizable hydrogels for 3D biodraagstructuren by rapid prototyping. Schelfhout J, Berneel E, Cornelissen M, Dubruel P.
7. **Biofoams, 2011, Italië.**
Poster. Development of photopolymerizable 3D hydrogel draagstructuren for tissue engineering purposes. Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P, Berneel E, Cornelissen M.
8. **Biofuture, 2011, België.**
Poster. Development of photopolymerizable 3D hydrogel draagstructuren for tissue engineering purposes. Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P, Berneel E, Cornelissen M.
9. **BSTE – Belgium Symposium in Tissue Engineering, 2012, België.**
Poster. Photopolymerizable 3D hydrogel draagstructuren for tissue engineering purposes.
10. **CESB – European Society for Biomaterials, 2013, Italië.**
Poster. Crosslinkable Pluronic® derivatives as building blocks for porous 3D soft tissue biodraagstructuren. Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Berneel E, Cornelissen M, Dubruel P.